

Aus der Klinik für Herz- und thorakale Gefäßchirurgie

Geschäftsführender Direktor:

Prof. Dr. med. Rainer Moosdorf

des Fachbereichs Medizin der Philipps-Universität Marburg
und des Universitätsklinikums Gießen und Marburg, Standort Marburg

**Unterdrückung einer Intimahyperplasie in venösen Transplantaten: Eine
tierexperimentelle Vergleichsstudie zum Einfluss von Decoy-
Oligodesoxynucleotiden und Quinapril auf die Expression
von pre-pro-Endothelin-1 und die Wirkung auf
die Endothelin Rezeptoren A und B**

Inaugural-Dissertation zur Erlangung des Doktorgrades der gesamten Medizin
dem Fachbereich Medizin der Philipps-Universität Marburg
vorgelegt von

Björn Kusch
aus Bielefeld

Marburg, 2005

Angenommen vom Fachbereich Medizin der Philipps-Universität Marburg

am: 24. November 2005

Gedruckt mit Genehmigung des Fachbereichs.

Dekan: Prof. Dr. med. Bernhard Maisch

Referent: Prof. Dr. med. Sebastian Vogt

Korreferent: Prof. Dr. med. Bernhard Maisch

für
Astrid, Bronislaw und Fabian

I	Zusammenfassung.....	6
1.	Problemstellung.....	8
2.	Einleitung.....	8
2.1.	Koronare Herzerkrankheit.....	8
2.2.	Aorto-koronare Bypassversorgung mit venösen Transplantaten.....	10
2.2.1.	Die „Venous Aortocoronary Bypass Graft Disease“.....	10
2.2.2.	Remodeling von venösen Bypässen und Therapieoptionen.....	11
2.3.	Endothel.....	13
2.3.1.	Endothelin.....	13
2.3.2.	Endothelin-Rezeptoren.....	14
2.3.3.	Angiotensin II.....	15
2.3.4.	Prädilektionsstellen für die Bildung von atherosklerotischen Plaques.....	15
2.4.	Medikamentöse Beeinflussung der Intimahyperplasie.....	16
2.4.1.	ACE-Hemmer Quinapril.....	17
2.4.2.	Renin-Angiotensin-System (RAS).....	20
2.4.3.	Bradykinin und der B ₂ -Rezeptor.....	21
2.4.4.	HOE 140 (Icatibant).....	23
2.4.5.	Stickstoffmonoxid und die endotheliale NO-Synthese.....	24
2.5.	Strategien zur Gen-Blockade.....	25
3.	Material und Methoden.....	28
3.1.	Genehmigung der Tierversuche.....	28
3.2.	Verwendete Substanzen.....	28
3.2.1.	Transkriptionsfaktor Decoy-Oligodesoxynukleotid (dODN).....	28
3.2.2.	Quinapril Hydrochloride.....	29
3.2.3.	Bradykinin-B ₂ -Rezeptor-Antagonist HOE 140 (Icatibant) und seine Verabreichung durch eine osmotische Minipumpe.....	29
3.2.4.	NO-Synthase-Inhibitor N ω -nitro-L-arginin-methylester-hydrochlorid.....	31
3.3.	Versuchstiere.....	31
3.4.	Operatives Vorgehen.....	32
3.4.1.	Narkoseführung, Kontrolle der Vitalparameter und Schmerzlinderung.....	32
3.4.2.	Operationsbericht und Nachsorge.....	33
3.4.3.	Fotodokumentation des operativen Eingriffs.....	35
3.4.4.	Materialien – Implantation.....	42
3.4.5.	Materialien – Explantation.....	43
3.5.	Histologische Aufarbeitung.....	45
3.5.1.	Van Giesson und Haematoxylin-Eosin Färbung.....	45
3.5.2.	Immunzytochemische Färbung für den Endothelin A- und B- Rezeptor-Antikörper.....	45
3.5.3.	Histologische Begutachtung und Vermessung.....	46
3.6.	Datenauswertung.....	47
3.7.	Statistische Tests.....	47
3.7.1.	Kruskal-Wallis-Test.....	47
3.7.2.	U-Test nach Mann-Whitney.....	47

4.	Ergebnisse.....	48
4.1.	Anzahl der operierten Kaninchen.....	48
4.2.	Narkoseprotokoll.....	48
4.3.	Gruppenvergleiche.....	48
4.3.1.	Tiere mit medikamentösem Behandlungsregime vs. Kontrolle.....	48
4.3.2.	Tiere mit decoyODN Applikation vs. Kontrolle.....	49
4.3.3.	Bypassverschlussraten.....	51
4.3.4.	Semiquantitativer Nachweis von Antikörpern gegen Endothelin-A und Endothelin-B-Rezeptoren im histologischen Präparat nach dODN-Behandlung.....	52
4.3.5.	Behandlung durch consensus dODN.....	52
4.3.6.	Behandlung durch mutierte dODN.....	53
4.3.7.	Vene der kontralateralen Seite.....	54
4.3.8.	Zusammenfassung der Ergebnisse der immunhistologischen Untersuchungen zur Expression von Endothelin-A und Endothelin-B- Rezeptoren.....	56
4.3.9.	Nachweis von Bypassokklusionen.....	57
5.	Diskussion.....	58
5.1.	Wirkung von Schubspannung auf das Gefäßendothel.....	58
5.2.	Wirkung von decoy Oligodesoxynucleotiden gegen das Aktivatorprotein-1 auf die Endothelin-1 Ausschüttung.....	59
5.3.	Wirkung von Quinapril auf die Endothelin-1 Ausschüttung.....	59
5.4.	Expression des Endothelin-A und Endothelin-B Rezeptors.....	61
5.5.	Auswahl des Tiermodells und Einfluss einer Antikoagulation.....	62
5.6.	Methodenkritik.....	64
5.7.	Die lokale gentherapeutische Behandlung zur Überwindung der „venösen Bypasskrankheit“ nach aorto-koronarem Bypass – Eine Option für die Zukunft?.....	67
6.	Abkürzungen.....	73
7.	Literaturverzeichnis.....	74
8.	Anhang.....	87
8.1.	Meine akademischen Lehrer.....	87
8.2.	Danksagung.....	88
8.3.	Publikationen.....	89

I Zusammenfassung

Die Verwendung des venösen aorto-koronaren Bypasstransplantats stellt ein wesentliches palliatives Behandlungskonzept zur kardiochirurgischen Revaskularisation nach Stenose oder Verschluss einer Koronararterie in Folge einer koronaren Herzerkrankung dar. Postoperativ können erhöhte intraluminale Druckverhältnisse in den Venentransplantaten eine deutliche Veränderung der Gefäßwand verursachen. Diese „venous aortocoronary bypass graft disease“ zeichnet sich durch eine Intimahyperplasie und weitere degenerative Veränderungen innerhalb der Media aus. Neben dieser Intimahyperplasie kommt es zu einer zusätzlichen Einlagerung von Lipiden, ähnlich der pathologischen Befunde der Atherosklerose. In der Konsequenz beobachtet man bei Patienten nach herzchirurgischen venösen Revaskularisationsmassnahmen innerhalb des ersten postoperativen Jahres eine Bypassverschlussrate von bis zu 20%. In den Folgejahren kann mit einem jährlichen Anstieg der Verschlussrate von 1-2% innerhalb der ersten fünf postoperativen Jahre und vom fünften bis zehnten Jahr mit einer jährlichen Verschlussrate von 2% gerechnet werden. Ein entscheidender Proliferationsstimulus für die Intimahyperplasie ist die druckabhängig erhöhte Ausschüttung von Endothelin mit konsekutiver Hochregulation des Endothelin-Rezeptors im Endothel und in der glatten subendothelialen Gefäßmuskulatur. Im Rahmen der Arbeit wird anhand eines Kaninchenmodells mit Bypasstransplantaten der Vena jugularis auf die gleichseitige Arteria carotis überprüft, in wie weit ein gentherapeutischer Ansatz mittels decoy-Oligodesoxynukleotiden (dODN) eine Blockade der Transkription des pre-pro-Endothelin-1 Gens in das pre-pro-Endothelin-1 herbeiführt und dadurch die Endothelinausschüttung hemmt. Verglichen wurde diese Methode mit der Wirkung des ACE-Hemmers Quinapril auf die Transkriptionskontrolle (über NO und cGMP), welche ebenfalls eine Reduktion der Intimahyperplasie bewirken soll. Zusätzlich wurden Kontrollgruppen ohne Behandlung, mit mutiertem Decoy (zur Überprüfung der Selektivität), sowie einem Kinin-Rezeptor Antagonist (Icatibant) und einem Hemmer der NO-Freisetzung (L-NAME) eingesetzt. Insgesamt wurden 51 Kaninchen operiert, bei 48 Tieren nach 28 Tagen die Venentransplantate zur histomorphometrischen Auswertung, bzw. zur immunhistochemischen qualitativen und semiquantitativen Untersuchung entnommen. Trotz intraoperativ einwandfreier Anlage der End-zu-Seit anastomosierten Gefäße und problemlosem Durchfluss fanden wir bei bewusster Vermeidung jeglicher Antikoagulation, eine hohe Rate von Bypassokklusionen. Diese betrug in einzelnen Gruppen bis zur 48%. Diese Transplantate wurden von der Auswertung ausgeschlossen. Nach entsprechender statistischer Überprüfung

kann in der Gruppe mit consensus decoyODN im Vergleich zur unbehandelten Kontrolle eine signifikante Reduktion der Intimahyperplasie nachgewiesen werden ($p=0.022$). Eine offensichtliche Reduktion von Endothelin-A- und B-Rezeptoren durch die dODN-Behandlung kann in den entsprechenden immunhistochemischen Färbungen aufgezeigt werden. Innerhalb der drei verglichenen Medikamentengruppen wurde kein signifikanter Unterschied im Sinne einer Reduktion der Intimahyperplasie gefunden. Die vorliegenden Daten ermutigen zu weiterführenden experimentellen und klinischen Untersuchungen über die Anwendung von dODNs bei venösen Transplantaten in der koronaren Bypass-Chirurgie.

1. Problemstellung

Der aorto-koronare Bypass ist ein wesentliches kardiochirurgisches Behandlungskonzept zur Myokardrevaskularisation bei Stenose oder Verschluss einer Koronararterie. In der Mehrzahl der Fälle wird hierfür ein autologes Venentransplantat verwendet. Im Rahmen dieses Verfahrens ist die Blutdruck induzierte und bis zum Gefäßverschluss führende Intima- und Mediahyperplasie des Venenbypasses ein mittel- bis langfristig limitierender Faktor. Bei diesem Prozess ist der Vasokonstriktor Endothelin einer der wichtigsten Mediatoren. Die vorliegende Arbeit befasst sich mit dem tierexperimentellen Vergleich von Verfahren, welche die Intimahyperplasie eindämmen. Verglichen wird ein gentherapeutischer Ansatz und der Einsatz des ACE-Hemmers Quinapril. Beide Substanzen können die Hochregulation der pre-pro-Endothelin-1-mRNA und somit die Bildung von Endothelin hemmen. Als Modell dient der venöse End-zu-Seit- Bypass auf die Arteria carotis des Kaninchens.

2. Einleitung

2.1. Koronare Herzerkrankung

Die koronare Herzkrankheit (KHK) ist seit Jahren die Haupttodesursache der Bevölkerung in den Industrieländern. Obwohl seit Ende der 60iger Jahre ihre allgemeine Inzidenz und Sterblichkeit innerhalb der Altersgruppe der 35-64 jährigen rückläufig ist, ist ihre Sterblichkeit insgesamt mit ca. 48% von allen Todesursachen hoch (*MONICA-Projekt; Koch K. 2000*). Nach dem letzten Bundesgesundheitsbericht von 1998 wurden im entsprechenden Beobachtungsjahr 777.538 Patienten mit ischämischer Herzkrankheit behandelt, von denen 183.736 Patienten starben. Hierunter waren 133.311 Fälle mit akutem Myokardinfarkt (AMI), von denen 87.739 (65,8 %) tödlich waren. Angaben über die komplette Höhe der Behandlungskosten der KHK lassen sich wegen fehlender Erhebungen nicht machen. Allerdings sind den Rentenversicherungsträgern nur für *Rehabilitationsmaßnahmen* des AMI im Jahre 1994 rund 3,09 Mrd. Euro an direkten Kosten entstanden (*Statistisches Bundesamt. 2002*). Die absoluten Behandlungskosten der KHK dürften demnach noch um ein Vielfaches höher liegen.

Die Entstehung der KHK ist multifaktoriell und beginnt oft schon im Jugend- und frühen Erwachsenenalter als schleichender Prozess (*Tuzcu EM et al. 2001*). Ihre klassischen

Risikofaktoren sind Hypertonie, Hyperlipidämie, Diabetes mellitus, Hyperhomozysteinämie und Nikotinabusus. Außerdem wirken ein stressreicher Lebensstil, Übergewicht, männliches Geschlecht, höheres Lebensalter, eine Infektion mit dem Bakterium *Clamydia pneumoniae* und eine genetische Belastung als nachgeordnete bzw. nicht beeinflussbare Risikofaktoren in die Entstehung der koronaren Herzerkrankung mit ein. Im Bereich genetischer Ursachen läßt sich nicht nur eine erhöhte familiäre Belastung feststellen. Die Schwere der KHK und des Bluthochdrucks korrelieren ebenfalls positiv mit dem Ausmaß von DNA-Schäden, die in peripheren Blutlymphozyten von Patienten charakterisiert wurden (*Botto N et al. 2001*).

Obwohl die genauen Ursachen der KHK bis dato noch nicht eindeutig bekannt sind, kann sie als lebenslanger chronischer Entzündungsprozess des Gefäßendothels angesehen werden. Ergänzend negativ wirkt die Thromben- und Plaquebildung am Endothel, die, progredient oder durch eine Plaqueruptur, auch akut zu einer Einengung bzw. dem Verschluss des Gefäßes führen kann (*Koenig W et al. 2003*). Nach der „Response-to-injury-Hypothese“, führt die mechanische Schädigung des Endothels durch erhöhten Blutdruck zu einer gesteigerten Lipidaufnahme in der Gefäßwand. Am Ort der Schädigung folgt eine Einwanderung von Thrombozyten und Monozyten. Letztere wandeln sich in Makrophagen um und setzen zellschädigende Sauerstoffradikale frei. Zusätzlich werden eingewanderte low-density-lipoproteins (LDL) oxidiert und wirken durch ihr Reaktionsprodukt ebenfalls toxisch auf das Endothel. Es resultiert ein weiterer Zelleintritt mit Verdickung der Gefäßwand. Ferner kommt es zur Proliferation der Gefäßmuskulatur und Invasion bis in die Intima. Zusätzlich wird die endotheliale NO-Synthase zerstört, so dass die vasorelaxierende Wirkung des Stickstoffmonoxids (NO) auf die Gefäßmuskulatur und die Blockade der Mono- und Thrombozytenadhäsion entfällt. Es kommt zu einer erhöhten Kontraktionsbereitschaft des Gefäßabschnitts. Die eingewanderten Zellen phagozytieren vermehrt LDL und werden zu Schaumzellen. Die zusätzliche Bildung von Kollagen, Proteoglykanen und Elastin resultiert in der Atherombildung und Plaque-bedingten Gefäßverengung (*Chilton RJ. 2001; Gielen S et al. 2001*). Distal der Stenose entsteht eine progredienten Minderversorgung mit Blut, wodurch eine Angina pectoris (AP) Symptomatik ausgelöst werden kann. Eine Plaqueruptur kann einen sofortigen und kompletten Gefäßverschluss verursachen, der zum akuten Herzinfarkt führt.

Trotz der verbesserten Eindämmung von Risikofaktoren, dem gesteigerten Gesundheitsbewusstsein der Bevölkerung, der stetigen Verbesserung der medikamentösen

Beeinflussbarkeit sowie von kardiologischen minimal-invasiven Behandlungskonzepten, stellt die aorto-koronare Bypassoperation in vielen Fällen die Therapie der Wahl dar.

2.2. Aorto-koronare Bypassversorgung mit venösen Transplantaten

Mit der erstmaligen Verwendung eines venösen aorto-koronaren Bypassgefäßes vollzogen Favaloro sowie Garrett und Kollegen Mitte der 1960er Jahre eine medizinische Pionierleistung (*Favaloro RG. 1968; Garrett HE, et al. 1973*). Mit der von ihnen dargestellten Methode stand eine chirurgische Möglichkeit bereit, einer Vielzahl von Patienten mit pectanginösen Beschwerden erfolgreich helfen zu können und in einigen Subgruppen von KHK-Patienten eine deutliche Verbesserung der Langzeitprognose zu erreichen. Mit den großen Erfolgen kam allerdings auch die Ernüchterung, dass es sich bei diesem Eingriff um eine rein palliative Therapie handelte, die wiederum neue Probleme schuf. In etwa 20% der operierten Patienten kommt es zu einem erneuten Auftreten von Angina pectoris innerhalb des ersten Jahres mit einer Zunahme der Inzidenz von ca. 4% pro Jahr in den dann folgenden 5 Jahren (*Cameron AA et al. 1995*). Innerhalb des ersten postoperativen Jahres kann eine Bypassverschlussrate von 15-20% festgestellt werden. Innerhalb der Folgejahre steigt die Verschlussrate um weitere 1 bis 2% per anno bis zum 6. Jahr. Vom 6. bis 10. postoperativen Jahr kommt es zu einer Steigerung auf 4-5% per anno. Es wurde belegt, dass nach 10 Jahren noch 60% der venösen Bypässe durchgängig sind, wovon nur die Hälfte frei ist von einer signifikanten Stenose (*Campeau L et al. 1984; Fitzgibbon GM et al. 1996; Sabik III JF et al. 2005*). Eine erneute operativ- oder minimal invasive Therapie muss bereits nach 5 Jahren bei jedem 4. Patienten erfolgen. Diese Rate steigert sich mit 19% operativ-invasiver Maßnahmen nach 10 Jahren und ca. 31% ab dem 12. Jahr nach der initialen Bypassoperation (*Weintraub WS et al. 1994*).

2.2.1. Die „Venous Aortocoronary Bypass Graft Disease“

Die „Venous Aortocoronary Bypass Graft Disease“ beschreibt die degenerativen Veränderungen venöser aortokoronarer Transplantate infolge intraluminaler Druckbelastung und Blutfluss bedingter Scherkräfte. Die schlechten Langzeitergebnisse durch eine relativ hohe Rate von frühem Graftversagen nach aorto-koronaren Bypassoperationen mit autologem Venentransplantat ergeben sich aus drei Hauptfaktoren: Thrombose, Intimahyperplasie und Atherosklerose. Im Wesentlichen sind die Mechanismen dieses Krankheitsbildes denen der

KHK sehr ähnlich (*Verma S et al. 2003*). Vor allem durch ihre wenig ausgeprägte Media können Venen dem arteriellen Blutdruck nur wenig Widerstand entgegensetzen. Eine dauerhafte Überdehnung mit Schädigung der Endothelschicht und der Media sind die Folge (*Cox JL et al. 1991*). Durch die Endothelläsion kommt es neben einer Aktivierung der Gerinnungskaskade zu einer Ausschüttung von Entzündungsmediatoren, ähnlich wie bei der KHK. Es folgt eine Überreaktion des Endothels mit Bildung einer Neointima, sowie einer Einlagerung von Lipiden in die geschädigten Zellschichten (*Verrier ED et al. 1996*). Durch eine frühzeitige medikamentöse Therapie mit Antikoagulantien und Lipidsenkern, kann eine suffiziente Reduktion von Thrombosen und ein Entgegenwirken der beschleunigten Atherosklerose des Venentransplantats erreicht werden. Jedoch ist das Problem der Intimahyperplasie bisher nicht gelöst. Durch die auf die Gefäßwand einwirkenden Fluss- und Druckverhältnisse kommt es u.a. zu einer Ausschüttung von Endothelin, das neben seiner Funktion als starker Vasokonstriktor auch die Proliferation von glatten Gefäßmuskelzellen bewirkt und ihre Invasion in die Intima unterstützt (*Porter KE et al. 1998; Lauth M et al. 2001*).

2.2.2. Remodeling von venösen Bypässen und Therapieoptionen

Als eine Möglichkeit der Behandlung ergab sich aus o.g. Beobachtungen die *Blockade* des Endothelin Rezeptors durch einen Antagonisten. Diese Methode stellte sich wegen zu großer toxikologischer Probleme bei Langzeitbehandlung als nicht vertretbar heraus (*Wagner AH et al. 2000*). Auf der Suche nach neuen Ansatzpunkten fanden Cattaruzza et al. heraus, dass ursächlich für das in erster Linie Blutdruck abhängige Remodeling der venösen Bypässe die pre-pro-Endothelin-1 (ppET-1) abhängige Synthese von Endothelin-1 (ET-1) durch die Endothelzellen und die Hochregulierung des Endothelin-B Rezeptors (ET_B-R) angesehen werden muss. Durch experimentellen Dehnungsstress an isolierten Rattenmyozyten konnte eine Aktivitätssteigerung des die ppET-1 Synthese regulierenden Transkriptionsfaktor-Aktivator-Protein-1 (AP-1) gezeigt werden (*Cattaruzza M et al. 2000a; Lauth M et al. 2001*).

In der vorliegenden Arbeit wurde deshalb versucht, mittels Transfektion von speziellen „decoy“ Oligodesoxynucleotiden die Wirkung des AP-1 zu neutralisieren und die Produktion von ET-1 mit konsekutiver Hochregulation des ET_B-Rezeptors auf der Ebene der Transkription zu unterdrücken. In einem ersten Arm wurde untersucht, in wie weit ein consensus Decoy im Vergleich zu einem mutierten Decoy und einer Kontrollgruppe die

Intimahyperplasie und Stenose des venösen Grafts verhindern kann. In einem zweiten Arm wurde die Wirkung des ACE-Hemmers Quinapril auf die ppET-1 Expression untersucht. Neben der Blutdruck senkenden Wirkung konnte in Voruntersuchungen mittels Reporter-Gen-Analysen gezeigt werden, dass ACE-Hemmer die druckabhängig gesteigerte Expression von ppET-1 und die Expression des ET_B-Rezeptors in der Arteria carotis bzw. der Vena jugularis des Kaninchens auf der Ebene der Transkription verhindern können (*Lauth M et al. 2001*). Dies geschieht über eine Steigerung der Stickstoffmonoxid-Konzentration mit einhergehender Erhöhung des intrazellulären cGMP, welches auf noch nicht geklärte Weise in die Transkription des ppET-1 Gens der Zelle eingreifen kann. In vitro konnte dieser Effekt durch die kombinierte Gabe mit dem Hemmer der endothelialen Stickstoffmonoxidsynthasen (eNOS), N ω -nitro-L-arginin-methylester-hydrochlorid (L-NAME) und dem Bradykinin-Rezeptor- Subgruppe-2 (B₂-Rezeptor)-Blocker HOE 140 (Icatibant) unterdrückt werden. Diese Beobachtungen legen eine direkte Beteiligung von NO bzw. eine indirekte Beteiligung des B₂-Rezeptors im Rahmen der Transkriptionssteuerung des ppET-1 Gens nahe.

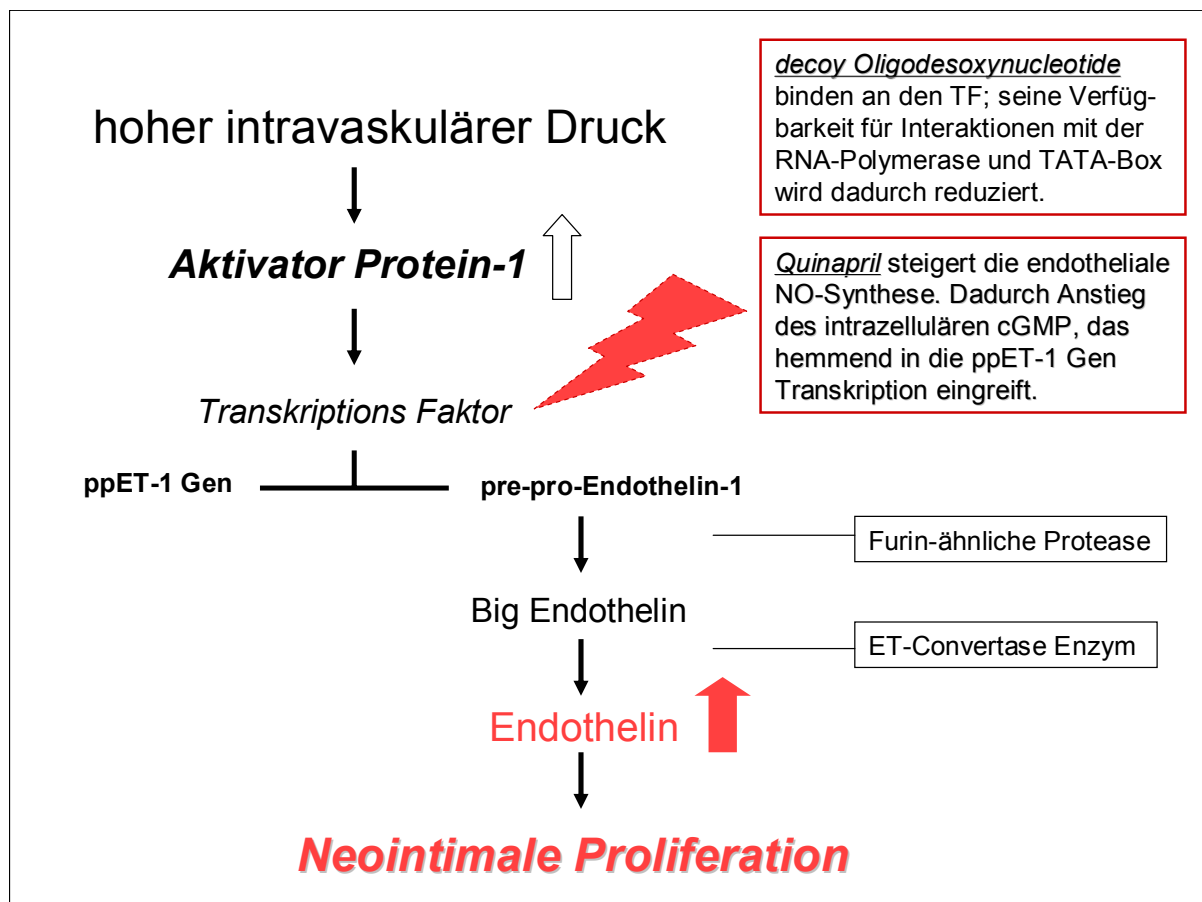


Abb. 1: Schematische Darstellung des Zusammenhangs von hohem intravaskulärem Druck und der Endothelin abhängigen neointimalen Proliferation mit zwei potentiellen Behandlungsansätzen.

Für die in vivo Untersuchung am Kaninchenmodell wurden entsprechend sechs Untersuchungsgruppen gebildet:

Kontrolle	Decoy, <i>nicht</i> mutiert	Quinapril
	Decoy, mutiert	Quinapril + L-NAME
		Quinapril + HOE 140

2.3. Endothel

Das Endothel ist die oberste Zellschicht der die Gefäße auskleidenden Intima. Ihr folgt die Tunica media mit netzartig verbundenen Muskelfasern und die Tunica externa aus lockerem kollagenem Bindegewebe, elastischen Fasern und Muskelbündeln. Letztere fixiert das Gefäß mit der Umgebung. Das Endothel sorgt neben dem Stoffaustausch zwischen intra- und extravasalem Raum vor allem für die Bildung und Freisetzung vasoaktiver Leithormone (Autakoide), die für den Gefäßtonus und somit für eine adäquate Gefäßperfusion von großer Bedeutung sind. Eine dieser Substanzen ist der „endothelial-derived-relaxing-factor“ (EDRF), der chemisch dem Stickstoffmonoxid (NO) entspricht. NO führt ebenso wie das Prostacyclin zur Relaxation der glatten Gefäßmuskulatur. Desweiteren wird vom Endothel das stark vasokonstriktorische Peptid Endothelin synthetisiert.

2.3.1. Endothelin

Das Peptid Endothelin (ET) wurde 1988 als 21 Aminosäuren großes Produkt von Endothelzellen entdeckt. Neben dem am besten untersuchten ET-1 gibt es noch die weiteren Isoformen ET-2 und ET-3, auf deren Unterschiede weiter unten eingegangen wird. Endothelin ist Teil eines der wichtigsten Regulatorsysteme für den Blutdruck und gilt als der stärkste bislang bekannte Vasokonstriktor (*Yanagisawa M et al. 1988*). Ein Kausalzusammenhang zwischen Endothelinen und der Entstehung von Atherosklerose und Hypertonie konnte von vielen Autoren bereits bestätigt werden (*Ito H et al. 1993; Lerman A et al. 1995; Ihling C et al. 1996; Dagassan PH et al. 1996; Minamino T et al. 1997*). Über diese Wirkungen hinaus, hat insbesondere das ET-1 noch weitere physiologische Eigenschaften:

positiv inotroper und chronotroper Effekt (*Ishikawa T et al. 1988*)

Synthesesteigerung von Angiotensin II, Stimulation von Muskelzell- und Fibroblastenproliferation (*Lüscher T et al. 2000*)

Direkte Blutdruckerhöhung im Rattenmodell mit Reversibilität nach Gabe eines ET-Antagonisten (*D'Uscio LV et al. 1998*)

Hypertonieinduktion durch erhöhte Expression von pre-pro-Endothelin in der Leber (*Niranjana V et al. 1996*)

Apoptose-Survival-Factor der Endothelzelle (*Shichiri M et al. 1997*)

Endotheline (ET) können in drei Isoformen unterteilt werden: ET-1, welches hauptsächlich in den Endothelzellen produziert wird, unterscheidet sich vom ET-2 und ET-3 durch zwei bzw. sechs Aminosäuren, die jeweils durch verschiedene Gene auf unterschiedlichen Chromosomen kodiert werden (*Inoue A et al. 1989*). Auf Chromosom sechs ist das humane Gen für das pre-pro-Endothelin-1 lokalisiert (*Bloch KD et al. 1989*). Beeinflusst wird die Genexpression u.a. durch Faktoren wie die zirkumferente Dehnung der Gefäßwand bei Hypertonie, die hydrostatische Kraft des Blutes auf die Gefäßwand und durch den s.g. „shear stress“, die abscherend reibende Kraft des Blutflusses auf das Endothel (*La M et al. 1995; Traub O et al. 1998*). Die Regulation der Expression erfolgt auf Ebene der Transkription, wodurch ein Ansatz für eine therapeutische Behandlung durch die direkte Beeinflussung mit decoy-Oligodesoxynukleotid und ACE-Hemmer gegeben ist.

2.3.2. Endothelin-Rezeptoren

Bisher sind zwei Rezeptoren für die Proteine der Endothelinfamilie bekannt, die als ET_A- und ET_B-Rezeptor bezeichnet werden (*Hosoda K et al. 1991; Ogawa Y et al. 1991*). Man findet sie vor allem im vaskulären System, der Lunge, dem Nervensystem, der Plazenta und in den Nieren. Beide Rezeptoren haben gleiche, aber auch völlig verschiedene Funktionen im Organismus. Während der ET_A-Rezeptor eine Vasokonstriktion vermittelt, kann der ET_B-Rezeptor mit Vasokonstriktion, aber auch mit Vasodilatation reagieren. Die Wirkungsart ist dosisabhängig. Die Signaltransduktion dieses 50kD Moleküls erfolgt G-Protein gekoppelt und wirkt über eine Erhöhung des Calciuminflux in die Zelle (*Pönicke K et al. 1998*). Beide Rezeptoren haben eine unterschiedliche Affinität zu den o.g. Endothelinen. Der ET_A-Rezeptor zeigt eine stärkere Affinität zum ET-1 und -2 im Vergleich zum ET-3. Andererseits ist die Bindungsstärke aller drei Endotheline am ET_B-Rezeptor fast gleich. Boulanger et al. (1990)

konnten zeigen, dass der ET_B-Rezeptor eine wichtige Rolle bei der Freisetzung von Stickstoffmonoxid spielt.

2.3.3. Angiotensin II

Als zweiten wichtigen Vasokonstriktor ist an dieser Stelle das Angiotensin II zu nennen. Dieses entsteht aus in der Leber synthetisiertem Angiotensinogen, welches durch Abspaltung eines Dekapeptids zu Angiotensin I wird und in der Lunge durch das „angiotensin-converting-enzyme“ (ACE) in Angiotensin II umgewandelt wird. Es wird angenommen, dass die situationsbedingte Ausschüttung o.g. Substanzen eine direkte Reaktion der Endothelzellen auf veränderte Strömungs- und Druckverhältnisse im Gefäß ist. (*Boegehold MA. 1998*). Wie die entsprechenden Informationen allerdings auf molekularer Ebene verarbeitet werden, ist bis dato noch weitgehend ungeklärt (*Davies PF. 1997*).

2.3.4. Prädilektionsstellen für die Bildung von atherosklerotischen Plaques

Bereits Rudolf Virchow publizierte im Jahre 1860 eine Abhandlung in der er nachwies, dass eine atherosklerotische Plaque vor allem an Verzweigungen arterieller Gefäße zu finden ist (*Virchow R. 1860*). Aufgrund der unterschiedlichen Strömungs- und Krafrichtungsvektoren des Blutflusses im Bereich einer Verzweigung, werden diese als ursächlich für eine Prädilektion angenommen (*Malek AM, et al. 1995*). Generell können zwei unterschiedliche Arten von einwirkender Kraft auf die Gefäßwand unterschieden werden: (1) „Shear stress“ (Schubspannung) wirkt primär auf das Endothel und (2) die druckbedingte Dehnung des Gefäßes, die alle Schichten umfasst. Die laminare Schubspannung an sich wirkt als Schutz vor atherosklerotischer Ablagerung, da durch eine gleichmässige Belastung des Endothels die vasodilatierenden und die Thrombozytenaggregation hemmenden Substanzen Stickstoffmonoxid (NO) und Prostazyklin-2 (PGI₂) ausgeschüttet werden (*Pohl U et al. 1986; Nishida K et al. 1992*). Für venöse Bypassgefäße in einem arteriellen Druckkreislauf gelten die gleichen Mechanismen. Vermehrt ist der Bereich der Anastomosen durch turbulente Strömung mit einem uneinheitlichen Kraftvektor, lokal verringerter Schubspannung, sowie einer großen lokalen Dehnung belastet. Somit befindet sich in diesem Bereich eine Prädilektionsstelle für Bypassokklusionen (s. Abbildung 2).

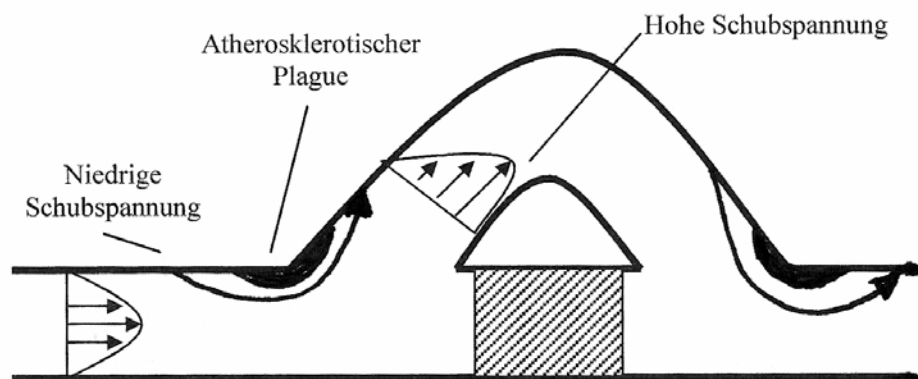


Abb. 2: Schubspannung und hämodynamische Kräfte in Gefäßen

Im Bereich von veränderter Strömung innerhalb eines Gefäßes z.B. durch Stenosen, Verzweigungen, o.ä. kommt es zur Verschiebung der Kraftvektoren und Änderung einer laminaren in eine turbulente Strömung. Diese Bereiche sind prädisponiert für eine Plaqueanlagerung. Gezeigt ist der veränderte Kraftvektor in Abhängigkeit der Flussrichtung. Neben der tangentialen Schubspannung (shear stress) durch den Blutfluss, die direkt auf die Endothelzellen wirkt, verursacht der Blutdruck eine dehnende, vertikal einwirkende Kraft auf die Gefäßwand (nicht dargestellt).

2.4. Medikamentöse Beeinflussung der Intimahyperplasie

Eine suffiziente und klinisch anwendbare Prävention oder Therapie der Intimahyperplasie von venösen Transplantaten gibt es zur Zeit nicht. In den vorhergehenden Abschnitten wurde der arterielle Blutdruck in einem venösen Bypasstransplantat mit seinen Folgen als Ursache einer Intimahyperplasie in diesen Gefäßen dargestellt. Die Druckbelastung führt zu einer direkten mechanischen Gewebeschädigung und der Freisetzung des vasokonstriktorisch und proliferationsfördernden Peptids Endothelin sowie von Angiotensin II. Als theoretische Therapieoption zum Transplantatschutz wäre eine Senkung des arteriellen Blutdrucks denkbar, was jedoch praktisch nie auf das physiologische Niveau des Venendrucks erfolgen kann (4-12 mmHg). In vitro Voruntersuchungen (Lauth M et al. 2000c) konnten zeigen, dass eine Reduktion der Intimahyperplasie durch Suppression der Endothelin-Expression auf der Ebene der Transkription möglich ist. Dies wurde einerseits durch die Gabe eines ACE-

Hemmers erreicht, der über die Erhöhung von Stickstoffmonoxid zu einem intrazellulären Anstieg von cGMP führt, welches über einen noch nicht identifizierten Mechanismus hemmend in die Transkription eingreift. Andererseits konnte mittels decoy Oligodesoxynucleotid die Blockade des Aktivator-Protein-1 für den entsprechenden Transkriptionsfaktor des Endothelins erreicht werden.

2.4.1. ACE-Hemmer Quinapril

Quinapril gehört neben sechs anderen ACE-Hemmern zur 2. Generation dieser Substanzgruppe und wurde Mitte der 80er Jahre entwickelt und eingeführt. Im Vergleich zur allerersten Substanz, dem Dipeptid-Analogon Captopril, handelte es sich beim Quinapril um ein dicarboxylhaltiges Tripeptid mit bicyclischem Ringsystem. Vorteile entstanden dadurch insbesondere in der Verteilung innerhalb des Gewebes, der Wirkstärke, Plasmahalbwertszeit und der Elimination (*Keilani T et al. 1995*). Um die orale Bioverfügbarkeit zu verbessern und eine vorzeitige Inaktivierung durch Magensäure oder Verdauungsenzyme zu verhindern, wird das Quinapril wie viele andere ACE-Hemmer auch, in Estherform als Prodrug verabreicht. Die Umwandlung in das aktive Quinaprilat erfolgt in der Leber.

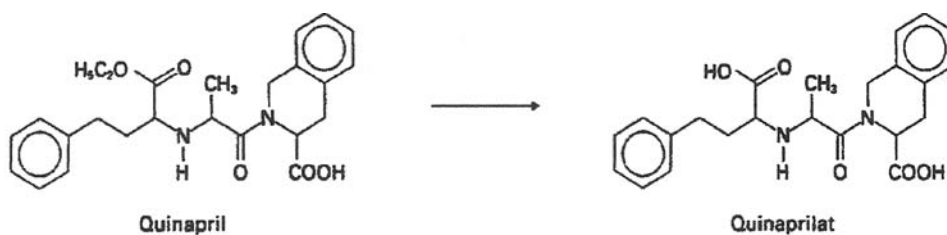


Abb. 3:

Strukturformel von Quinapril und von Quinaprilat nach Umwandlung in der Leber

Die klassischen Indikationsgebiete für ACE-Hemmer im Allgemeinen waren lange Zeit beschränkt auf die Behandlung der arteriellen Hypertonie, der Herzinsuffizienz, der linksventrikulären Dysfunktion und bei Zustand nach Myokardinfarkt. Zahlreiche klinische Studien konnten hier ihre große therapeutische Breite und Überlegenheit nachweisen (s.

Tabelle 1). Im Rahmen der TREND-Studie (Trial on Reversing ENdothelial Dysfunction) zeigte sich erstmals auch eine deutliche Verbesserung der Endothelfunktion nach Gabe von Quinapril in normotensiven Erwachsenen ohne ausgeprägte Hyperlipidämie oder Herzinsuffizienz (*Mancini GB et al. 1996*). Als ursächlich wurde eine vermehrte Produktion von Stickstoffmonoxid (NO) angenommen, die zu einer Gefäßerweiterung beiträgt. Die HOPE-Studie (Heart Outcomes Prevention Evaluation) ergab, dass der ACE-Hemmer Ramipril im Vergleich zu einem Placebo erstmals auch hoch wirksam in der Senkung des kardiovaskulären Risikos bei atherosklerotischen Risikopatienten eingesetzt werden kann. Der kombinierte Endpunkt aus Herzinfarkt, Schlaganfall und kardiovaskulärem Tod wurde durch die Gabe des ACE-Hemmers um 22% deutlich verringert. Auffallend war die Tatsache, dass der positive Effekt nicht in nennenswertem Umfang durch eine Ramipril-induzierte Blutdrucksenkung zustande kam. Es wurde in diesem Zusammenhang die Hypothese für eine Vasoprotektion durch ACE-Hemmer auch bei vorgeschädigten Gefäßen formuliert. (*Yusuf S et al. 2000*). Innerhalb der Gruppe der ACE-Inhibitoren zeigen sich jedoch Ungleichheiten in Bezug auf die vasoprotektive Potenz durch unterschiedlich hohe Gefäßaffinitäten zugunsten von Quinapril (*Hornig B et al. 1998*).

Studie	ACE-Hemmer	Erkrankung	Ergebnis	Literatur
CONSENSUS	Enalapril vs. Placebo	NYHA IV	Mortalität ↓	Kjekshus J, et al. Am J Cardiol. 1992
SOLVD	Enalapril vs. Placebo	NYHA II+III	Mortalität ↓	Rogers WJ, et al. J Am Coll Cardiol. 1994
V-HeFt II	Enalapril vs. Hydralazin + ISDN	NYHA II+III	Mortalität ↓, plötzl. Herztod ↓	Johnson G, et al. Circulation. 1993
SAVE	Captopril vs. Placebo	Myokardinfarkt, asympt. Dysfunktion	Mortalität ↓ Reinfarktrate ↓	Moye LA, et al. Am J Cardiol. 1991
CONSENSUS II	Enalaprilat/Enalapril vs. Placebo	Myokardinfarkt	Mortalität unverändert	Bonarjee VV, et al. Am Heart J. 1996
AIRE	Ramipril vs. Placebo	Myokardinfarkt Sympt. Dysfunktion	Mortalität ↓	Cleland JG, et al. J Cardiovasc Pharmacol. 1993
ISIS-4	Captopril vs Placebo	Myokardinfarkt	Mortalität ↓	Lancet. 1995
GISSI-3	Lisinopril vs. offene Kontrolle	Myokardinfarkt	Mortalität ↓	Avanzini F, et al. Am Heart J. 2002
TRACE	Trandolapril vs. Placebo	Myokardinfarkt Sympt. Dysfunktion	Mortalität ↓	Kober L, et al. N Engl J Med 1995
SMILE	Zofenopril vs. Placebo	Myokardinfarkt	Mortalität ↓	Borghi C, et al. Am J Cardiol. 1996

Tab. 1:

Studien, die die überlegene Wirkung von ACE-Hemmern auf die Gesamtmortalität bei Herzinsuffizienz und nach Herzinfarkt belegen konnten. NYHA: Klassifikation der Herzinsuffizienz durch die New York Heart Association. Gradeinteilung von I (min) bis IV (max). ISDN: Isorbiddinitrat.

2.4.2. Renin-Angiotensin-System

Der Ansatzpunkt für Medikamente der Gruppe der ACE-Hemmer ist das Renin- Angiotensin-System (RAS). Hierbei kann zwischen einem lokalen und einem generalisierten System unterschieden werden. Das RAS ist in Verbindung mit der Steuerung des Elektrolyt- und Wasserhaushalts auch für die Blutdruckregulation zuständig. Kommt es einerseits zu einem Abfall der Natrium-Konzentration oder des Blutdrucks, oder erfolgt andererseits eine β -adrenerge Stimulation, sezerniert die Niere das proteinspaltende Enzym Renin. Das ins Blut sezernierte Renin spaltet vom Angiotensinogen (ein α_2 -Globulin) der Leber ein Dekapeptid ab. Dieses Dekapeptid ist das inaktive Angiotensin I. Das Angiotensin-Converting-Enzyme (ACE) welches neben anderen Geweben vornehmlich in der Lunge produziert wird, spaltet zwei weitere Aminosäuren ab, so dass dadurch das hochaktive Oktapeptid Angiotensin II entsteht.

Angiotensin II ist der z.Zt. stärkste bekannte Vasokonstriktor. Er setzt direkt an den Arteriolen an und führt zu einer unmittelbaren Blutdruckerhöhung. Des weiteren wird im ZNS das Kreislaufzentrum stimuliert, wodurch das Durstzentrum angeregt und der „Salz-Appetit“ ausgelöst wird. Eine erhöhte Flüssigkeitsaufnahme mit konsekutiver Blutvolumenzunahme und einer Blutdruckerhöhung sind die Folgen. Neben 10% von frei zirkulierendem ACE im Körper, macht das lokale, membrangebundene ACE den Hauptwirkungsbestandteil aus. Dieser findet sich vornehmlich im Endothel der Gefäße, wobei es eine Verteilung (und Wirkung) zugunsten der mikrovaskulären Komponenten gibt. (*Johnston CI et al. 1992*) Dies erklärt die Beobachtung der besseren Wirkung von ACE-Hemmer im mikrovaskulären Bereich.

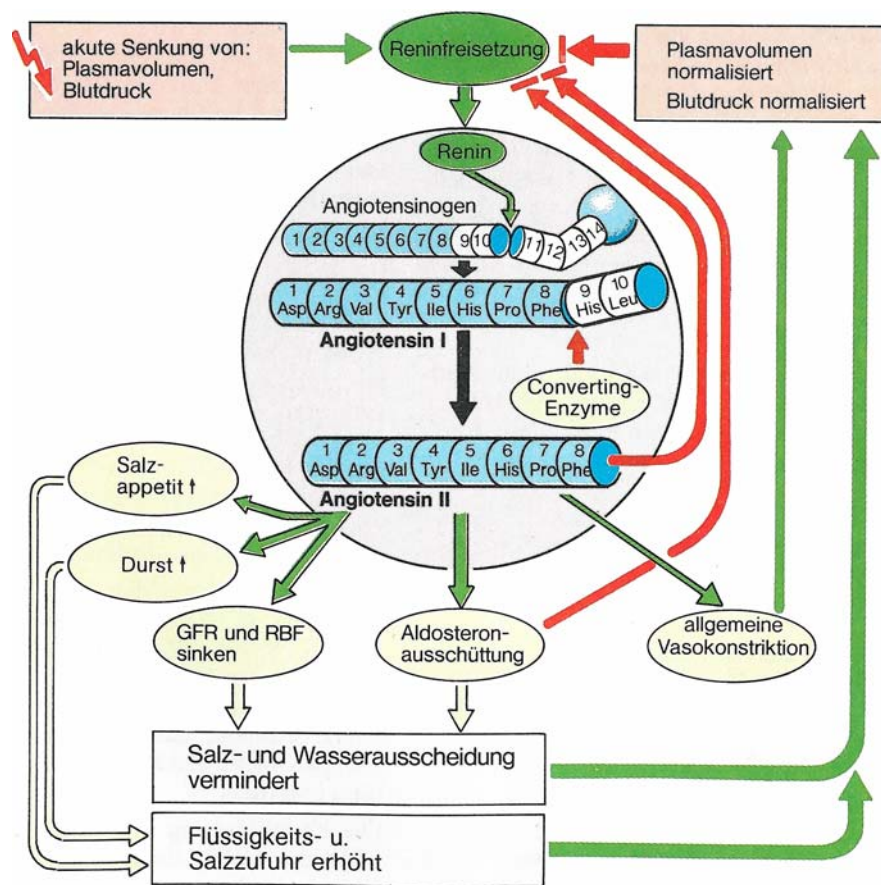


Abb. 4: Schematische Darstellung des Renin-Angiotensin-System
 aus: Silbernagel / Despopoulos, Taschenatlas der Physiologie, S. 153, Thieme Verlag,
 4. Auflage (1991)

2.4.3. Bradykinin und der B₂-Rezeptor

Die Entdeckung des Bradykinins geht auf die im Jahre 1909 von Abelous und Bardier gemachte Beobachtung zurück, dass intravenös injizierter Urin zu einem vorübergehenden Blutdruckabfall führt. In den Folgejahren wurde unter der Vorstellung, dass es sich bei den entdeckten Kininen um Kreislaufhormone handelt, das Kallikrein-Kinin-System nach und nach entschlüsselt. Im Jahre 1960 konnten Elliot und Kollegen dann die komplette Struktur des Bradykinins darstellen (Regoli D et al. 1980).

Die biologische Funktion des Bradykinins ist abhängig von den jeweils angesprochenen Rezeptoren. Regoli und Kollegen teilten 1980 die bisher entdeckten Bradykininrezeptoren in

die Subgruppen B₁ und B₂ auf (Regoli D et al. 1980). Die einzelnen Auswirkungen auf den Organismus sind unten gelistet zu entnehmen. Obwohl die physiologische Reaktion des Gefäßendothels auf das Bradykinin aus einer Vasodilatation besteht, ist bei einer Vaskulopathie der gegenteilige Effekt zu erkennen: Bedingt durch die Schädigung des Endothels, tritt Bradykinin in direkten Kontakt mit Rezeptoren der glatten Gefäßmuskulatur und führt zu einer Vasokonstriktion (Barabe J et al. 1979). Bei dem in Bezug auf seine Blockade interessanten B₂-Rezeptor, handelt es sich um einen G-Protein-gekoppelten Oberflächenrezeptor, der aus sieben Transmembrandomänen besteht und in Form einer Schleife angeordnet ist (Hess JF et al. 1994; Menke JG et al. 1994). Durch Aktivierung erfolgt die Signaltransduktion über eine Phospholipase C getriggerte Hydrolyse von Phosphoinositol und den intrazellulären Anstieg der Calcium-Konzentration. Der B₂-Rezeptor unterliegt einer Down-Regulation bei Langzeitstimulation.

Wirkung nach Stimulation des B₁-Rezeptors

Kontraktion und Relaxation der glatten Muskulatur
Kardioprotektiver Effekt durch verbesserte Reperfusion, Arrhythmiekontrolle, Kontraktion
Schmerzbahnung und -leitung durch sensorische Nervenfasern
Stimulation des Immunsystems und erhöhte Ausschüttung von Chemokinen (IL-1 und TNF1 α) durch Makrophagen

Wirkung nach Stimulation des B₂-Rezeptors

Vasodilatation, antiproliferative und antithrombotische Effekte durch Freisetzung von Stickstoffmonoxid
Regulation des Gefäßtonus durch Vasodilatation
Schmerzwahrnehmung und -weiterleitung
Katecholaminfreisetzung
Verbesserung der Glukosetoleranz
Atemwegssensibilisierung und Bronchokonstriktion
Induktion von Entzündungen
Ödembildung durch Mastzellstimulation und Histaminfreisetzung
Permeabilitätssteigerung der Blut-Hirn-Schranke
Beeinflussung renaler Funktionen der Urinproduktion

2.4.4. HOE 140 (Icatibant)

Die Entdeckung und erste Synthese eines Bradykinin B₂-Rezeptorantagonisten wurde 1985 von Vavrek und Kollegen beschrieben (*Vavrek RJ et al. 1985*). Die anfänglichen Versuche der Antagonisten-Synthese durch sterische Veränderung des C-terminalen Dipeptidendes von Bradykinin erbrachte im Tierversuch jedoch nur eine schwache antagonistische Wirkung am B₂-Rezeptor aufgrund der zu geringen Affinität (*Vavrek RJ et al. 1985*). In der Folgezeit konnte durch weitere sterische Veränderungen relativ rasch die Affinität verbessert werden, so dass Rhaleb et al. im Jahre 1991 mit der Substanz D-Arg-[Hyp³,D-Phe⁷,Leu⁸]bradykinin die erste Generation von Bradykinin B₂-Rezeptorantagonisten vorstellte (*Rhaleb NE et al. 1992*). Einschränkend ist allerdings zu erwähnen, dass die ersten Substanzen vornehmlich zu Rezeptorstudien im Tierversuch Verwendung fanden, da beim Menschen eine nur sehr geringe Wirkung bestand. Einerseits wurde dies erklärt mit einer schnellen Umwandlung in desArg⁹-Metabolite, die dann als B₁-Rezeptor-Antagonisten wirkten (*Rhaleb NE et al. 1992*). Andererseits wurde die Rezeptor-Halbwertszeit dadurch weiter verringert, dass die Metabolite als Substrat für Plasma- oder Gewebsproteasen dienten (*Wirth K et al. 1991*). Mit der Entdeckung und Einführung des HOE 140 (Icatibant) [D-Arg-[Hyp³,Thi⁵D-Tic⁷,Oic⁸]^{*}] wurde 1991 die zweite Generation der Bradykinin-B₂-Rezeptor-Antagonisten begründet (*Hock TJ et al. 1991*). Der große Vorteil und Unterschied bestand zum einen in seiner hohen Affinität für den B₂-Rezeptor und zum anderen in der langen Halbwerts- (und Funktions-) zeit von mehr als 60 min (*Hock TJ et al. 1991; Gobeil F et al. 1996*). Icatibant wurde beim Menschen in vielen Versuchsreihen zur Aufklärung der Rolle der Kinine eingesetzt. Dies waren klinische Studien zum Verständnis von Schmerzentstehung und -verarbeitung (*Dray A et al. 1993*), zur Rolle der Kinine in Entzündungsreaktionen (*Maggi LA. 1997*) sowie bei allergischen Atemwegserkrankungen (*Austin CE et al. 1994; Akbary AM. 1996*).

Neben der insgesamt höheren Selektivität und Bindungskapazität für den B₂-Rezeptor, zeigte sich beim HOE 140 eine niedrigere Affinität im Menschen verglichen zu tierischen B₂-Rezeptoren. Darüber hinaus hat Icatibant in humanem Gewebe eine geringe Potenz der zusätzlichen Blockade des B₁-Rezeptors, was in anderen Spezies (z.B. Kaninchen und Schwein) nicht nachweisbar ist (*Regoli D et al. 1993; Marceau F et al. 1994; Feletout M et al. 1995*). Somit bot sich das Kaninchenmodell für die Beobachtung einer ausschließlichen und selektiven Wirkung des HOE 140 auf den B₂-Rezeptor besonders an.

^{*} Hyp: trans-4- -Pro; Thi: β-(2-Thienyl)-Ala; Tic: [D]-1,2,3,4-Tetrahydroisoquinolin-3-yl-carbonyl; Oic: (3as,7as)-Octahydroindol-2-yl-carbonyl. (*Goodman L und Gilman L, 1999*)

2.4.5. Stickstoffmonoxid und die endotheliale NO-Synthese

Im Jahre 1980 publizierten Robert Furchgott und John Zawadzki ihre Beobachtung, dass Aortenringe bei intakter Endothelschicht eine acetylcholin-induzierte Vasodilatation zeigten, während eine direkte Stimulation der Gefäßmuskelzellen bei Endothelschädigung zu einer Vasokonstriktion führt (*Furchgott RF et al. 1980*). Sie postulierten das Vorhandensein einer bis dahin unbekannten Substanz im Endothel, die diesen Effekt auslöst und nannten sie endothelial-derived-relaxing-factor (EDRF). Sieben Jahre später konnte von Ignarro und Kollegen diese unbekannte Substanz als das freie Radikal Stickstoffmonoxid (NO) identifiziert werden (*Ignarro LJ et al. 1987*). Neben den vaskulären Effekten konnte in der Folgezeit auch eine große Bedeutung von NO im neuronalen Bereich, im Immunsystem und bei der Regulation der Thrombozytenfunktion nachgewiesen werden (*Radomski MW et al. 1987; Gross SS et al. 1995; Hawkins RD et al. 1998; Annane S et al. 2000*). NO wird mit Hilfe der NO-Synthase (NOS) aus dem terminalen Guanidino-Stickstoff der Aminosäure L-Arginin über die Zwischenstufe des N^G-hydroxy-L-Arginins und unter Freisetzung von L-Citrullin gebildet (*Palmer RM et al. 1988*). Es konnten für die NO-Produktion drei unterschiedliche Synthasen in zwei verschiedenen Gruppen verantwortlich gemacht werden: zur ersten Gruppe gehört die induzierbare NOS (iNOS). Sie produziert unabhängig von der Ca²⁺-Konzentration große Mengen von NO über einen langen Zeitraum und befindet sich außer im Lungengewebe noch in der Niere und in Entzündungszellen. Ihr wird eine große pathophysiologische Bedeutung bei der Sepsis und der Schocklunge (ARDS) beigemessen (*Rossaint R et al. 1993*). Die NO-Produktion der iNOS wird daher als schädlich beurteilt (*Hernandez-Pando R et al. 2001*). Zur zweiten Gruppe der NO-Synthasen gehört die neuronale (nNOS) und die endotheliale (eNOS) Stickstoff-Synthase. Beiden wird eine protektive Wirkung auf den Organismus zugeschrieben (*Venema RC et al. 1997; Heeringa P et al. 2002*). Beide Enzyme sind Ca²⁺/Calmodulin abhängig und produzieren NO in kleinen Mengen über kurze Zeiträume. Neben der vasodilatativen Potenz der eNOS, die letztendlich zu einer Erniedrigung des Blutdrucks führt, konnte auch eine Verhinderung der Proliferation von glatten Gefäßmuskelzellen nachgewiesen werden (*Forstermann U. 1994; Scott-Burden T et al. 1992*). Zusätzlich beeinflusst die eNOS negativ die Plättchenaggregation (*Radomski MW et al. 1990*), die Leukozytenadhäsion an das Endothel (*Kubes P et al. 1991*) und die Angiogenese (*Ziche M et al. 2000*). Die Produktion von NO durch die eNOS wird durch zwei Mechanismen induziert: (1) durch Veränderung der intrazellulären Ca²⁺-Konzentration nach Rezeptorstimulation durch Mediatoren wie Serotonin, Bradykinin und Acetylcholin. (2) durch einen calciumunabhängigen Mechanismus direkt über die Wirkung von Schubspannung

auf das Endothel. Die physikalische Kraft aktiviert die Phosphatidylinositol-3-OH-Kinase, die wiederum eine Serin-Threoninkinase durch Phosphorylierung aktiviert. Das entstehende Reaktionsprodukt ist in der Lage die endotheliale NOS zu aktivieren und zu einem NO-Anstieg innerhalb des Gewebes zu führen (*Michel T et al. 1993*).

Zur Verifizierung der gemachten Beobachtungen können durch gezieltes und ungezieltes Unterdrücken der NOS entsprechend pathologische Zustände herbeigeführt werden. *Spezifische* Inhibitoren für die eNOS sind nicht bekannt. Neben N^G-monomethyl-L-arginin (L-NMMA) und N(5)-(1-iminoethyl)-L-ornithin (L-NIO), ist das N^ω-nitro-L-arginin-methylester-hydrochlorid (L-NAME) aber eine Substanz, die alle drei Formen der NOS über die Blockade der Arginase hemmt (*Pfeiffer S et al. 1996*). Hierbei wird das Guanidino-Stickstoff Atom kompetitiv durch das L-arginin Analogon besetzt und die NO-Freisetzung direkt verhindert (*Böger RH et al. 2001*). Entsprechend konnte bei verminderter Bio-Verfügbarkeit von eNOS in mehreren Untersuchungen ein Zusammenhang mit der Entstehung von Hypertonie, Arteriosklerose, kardiale Hypertrophie, Diabetes mellitus und schlechter Wundheilung nachgewiesen werden. (*Lee PC et al. 1999; Blair A et al. 1999; Reaves PY et al. 2003*). Im Tierversuch wurde durch die Gabe von L-NAME ferner eine Steigerung der vaskulären Permeabilität innerhalb der koronaren Gefäßbahn nachgewiesen, was für die Invasion endothel-toxischer Substanzen und die Pathogenese von Endothelstörungen von Bedeutung ist (*Sitniewska EM et al. 2001*).

2.5. Strategien zur Gen-Blockade

Die genetische Information des Menschen ist in seiner DNA gespeichert. Damit aus dieser Information z.B. ein Protein entsteht, ist ihre Transkription in RNA notwendig. Die Transkription an sich wird durch DNA-abhängige RNA-Polymerasen katalysiert, die Ribonucleotide in den neu zu bildenden Strang einbauen. Zu einer Wechselwirkung zwischen Polymerase und Promotorregion (und somit zur Transkription) kommt es erst bei Anwesenheit von Transkriptionsfaktoren. Im untersuchten Fall führt die Transkription des pre-pro-Endothelin-1-Gens zur Expression von pre-pro-Endothelin-1 mit weiterer Umwandlung in Endothelin. Wird die Transkription durch decoy-Oligodesoxynucleotide (dODN) gegen das Transkriptionsfaktor-*Aktivatorprotein-1* (AP-1) aktiv gehemmt, dockt das eingeschleuste decoyODN an die korrespondierende Bindungsstelle des Transkriptionsfaktors an und reduziert seine Verfügbarkeit für die Transkription. Folge ist

eine reduzierte bis aufgehobene Produktion von Endothelin und die damit einhergehende down-Regulation des ET-Rezeptors. Bei mutiertem Decoy besteht keine Affinität und Beeinflussung, da die dODN nicht an den Transkriptionsfaktor binden kann. (*Colman A et al. 1990; Bielinska A et al. 1990*). Eine weitere Möglichkeit zur Gen-Blockade ist das Einschleusen von antisense-ODN. Diese 15 bis 20 Basen langen Einzelstränge haben eine Sequenz, die komplementär zu einem Segment der mRNA der Zielzelle ist. Durch Bindung an dieses Segment wird der Abschnitt für die Translation in ein biologisch aktives Produkt (Protein) unzugänglich. Eine dritte Möglichkeit zur Unterdrückung einer Gen-Antwort ist die Verwendung veränderter RNA-Segmente. Diese Ribozyme zerstören spezielle mRNA-Sequenzen der Zielzelle. Die den Enzymen ähnlichen Strukturen haben zum einen katalytische Abschnitte, die andere RNA-Moleküle sequenztypisch spalten können und zum anderen eine benachbarte Sequenz, die das entsprechende Ziel als solches erkennt.

Darüber hinaus besteht die Option des Gentransfers von aktiven Transgenen in die Zielzelle zur Gentherapie. Diese DNA Segmente können mit viralen Vektoren (*Brody SL et al. 1994; Newman KD et al. 1995*) oder mechanisch unterstützt durch Ultraschall (*Miura S et al. 2002*) oder durch hohe atmosphärische Drücke (*Mann MJ et al. 2000*) in die jeweiligen Zellen eingebracht werden.

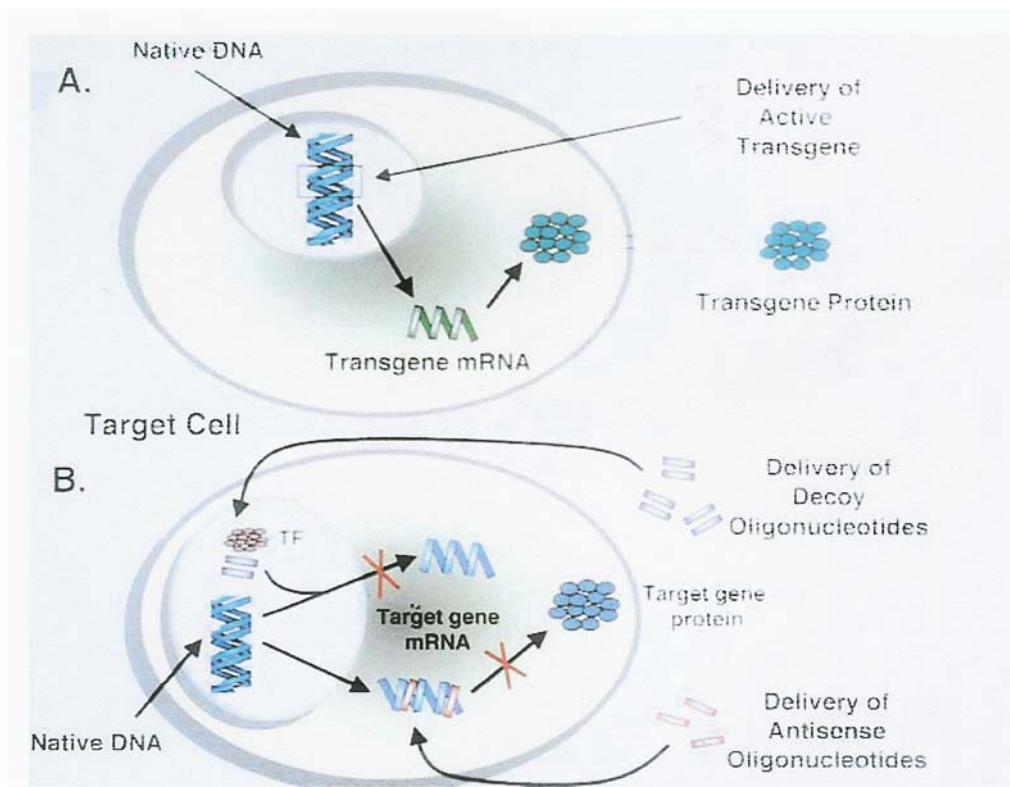


Abb. 5: Möglichkeiten der Gentherapie

(A) zeigt die Synthese eines veränderten, transgenen Proteins durch initiale Einschleusung von veränderter DNA in die Zielzelle und deren Integration in die zelluläre Doppelstranghelix (Gen Transfer). Im Gegensatz dazu bleibt die native DNA in (B) unverändert. Das eingeschleuste decoy-Oligodesoxynukleotid dockt an den Transkriptionsfaktor (TF) an und blockiert ihn für die Transkription und Proteinbiosynthese. Antisense Oligodesoxynucleotide verbinden sich komplementär mit einem Segment der Zielzellen-mRNA (Gen Blockade).

aus: Dzau VJ et al. *J Thorac Cardiovas Surg.* 2001; 121 (2):207

3. Material und Methoden

3.1. Genehmigung der Tierversuche

Die Tierversuche wurden durch den „Antrag auf Genehmigung von Tierversuchen“ im Rahmen des Tierschutzgesetz in der Fassung vom 25.05.1998 beim Regierungspräsidium in Giessen beantragt und dessen Durchführung durch o.g. Behörde genehmigt (AZ: II 25.3 – 19 c 20-15 (1) MR 20/16 – Nr. 01/2000).

3.2. Verwendete Substanzen

3.2.1. Transkriptionsfaktor Decoy-Oligodesoxynukleotid (dODN)

Die verwendeten Doppelstrang-ODNs wurden nach Hybridisierung aus Einzelstrang ODN durch die Abteilung für Herz- und Kreislaufphysiologie der Universität Göttingen bereitgestellt. Die Effizienz einer Transfektion an isolierten Jugularvenen des Kaninchens betrug lt. Herstellerangaben > 85%. (*Wagner AH et al. 2000*). Die Einzelstrang dODN wurde über die Firma Eurogentec (Köln, Deutschland) bezogen. Zur Anwendung kamen folgende Sequenzen:

AP-1cons: 5'-CGCTTGATGACTCAGCCGGAA-3'
3'-GCGAACTACTGAGTCGGCCTT-5'

AP-1mut: 5'-CGCTTGATTACTTAGCCGGAA-3'¹
3'-GCGAACTAATGAATCGGCCTT-5'

Die ODNs wurden nach Herstellung in Vials zu je 50 µl abgefüllt (bei 0,4 mmol/l) und ohne Unterbrechung der Kühlkette bei mindestens –4°C bis zur intra-operativen Verwendung gelagert. Unmittelbar vor der Transfektion wurde eine Portion des ODN aufgetaut und mit 1,5 ml physiologischer Kochsalzlösung 0,9%ig vermischt. Nach Reinigung des Venentransplantats mit NaCl-Lsg. erfolgte die Transfektion des Präparats und Inkubation in der Lösung für eine Stunde bei Raumtemperatur. Nach dieser Zeit wurde ohne weitere Spülung sofort transplantiert. Da die Decoys als getestete und gebrauchsfertige Substanz bezogen wurden, konnte auf eine erneute Messung der Effizienz der Transfektion innerhalb der Versuchsanordnung verzichtet werden.

¹mut = Mutierter Decoy. Die mit Fettdruck versehenen Buchstaben markieren die Mutation. Die Basen Guanin und Cytosin wurden isoliert durch Thymin ausgetauscht.

3.2.2. Quinapril Hydrochloride

Synonym: *2-[2-[[1-(Ethoxycarbonyl)-3-phenylpropyl]-amino]-1-oxopropyl]-1,2,3,4-tetrahydro-3-isoquinolinecarboxylic acid monohydrochloride*

Der Angiotensin-Converting-Enzyme Hemmer Quinapril wurde in Pulverform bezogen (Fa. Parker-Davis, Holland, MI, USA) und gewichtsadaptiert pro Tier und Tag individuell über das Trinkwasser appliziert. Als Tagesdosis galten 3mg/kgKG. Der Applikationszeitpunkt lag am Abend, so dass bei Nichterreichen der Tagesdosis der Rest oral und auf 2,5ml Wasser gelöst oral über eine Spritze nachverfüttert wurde. Die Lagerung der Substanz erfolgte bei 2-8°C im Kühlschrank.

3.2.3. Bradykinin-B₂-Rezeptor-Antagonist HOE 140 (Icatibant) und seine Verabreichung durch eine osmotische Minipumpe

Icatibant wurde in Pulverform von der Firma Hoechst Marion Roussel (Höchst, Frankfurt, Deutschland) bezogen. Bedingt durch seine peptidähnliche Struktur und der damit einhergehenden Gefahr von Unwirksamkeit bei bakterieller Kontamination (Spaltung durch Proteasen), konnte es nicht über das Trinkwasser gegeben, sondern musste mittels einer Minipumpe verabreicht werden (ALZET Osmotic Pumps model 2ML4, ALZET Corp. Palo Alto, CA, USA). Entsprechend dem Versuchsprotokoll wurden die Pumpen steril unter einer Clean Bench mit 0,3mg/kgKG/die HOE 140 nach Lösung in 2ml Wasser für Injektionszwecke befüllt und verschlossen. Die Implantation der Pumpe erfolgte 7 Tage vor der Bypass-OP. Icatibant wurde im Eisfach bei mindestens -4°C gelagert. Die Pumpe bestand aus zwei Teilen: Das zu füllende Reservoir hatte eine Länge von 40 mm bei einem Durchmesser von 14 mm. Das biokompatible Material bestand im Kern aus einem thermoplastischen Hydrocarbon-Elastomer mit einer äußeren Umhüllung aus Celluloseester-Beschichtung. Die Kunststoffkappe bestand aus Polyethylen mit einem mittig angebrachten Edelstahlstift. Das Gesamtgewicht ohne Füllung betrug 5,1g bei einer Länge von 51 mm und einem Fassungsvermögen von 2,0 ml. Die tägliche Pumprate betrug bei 37°C Celsius Körpertemperatur 2,5µl/hr (± 0,5µl/h). Die Laufzeit betrug bei kompletter Befüllung 28 Tage.

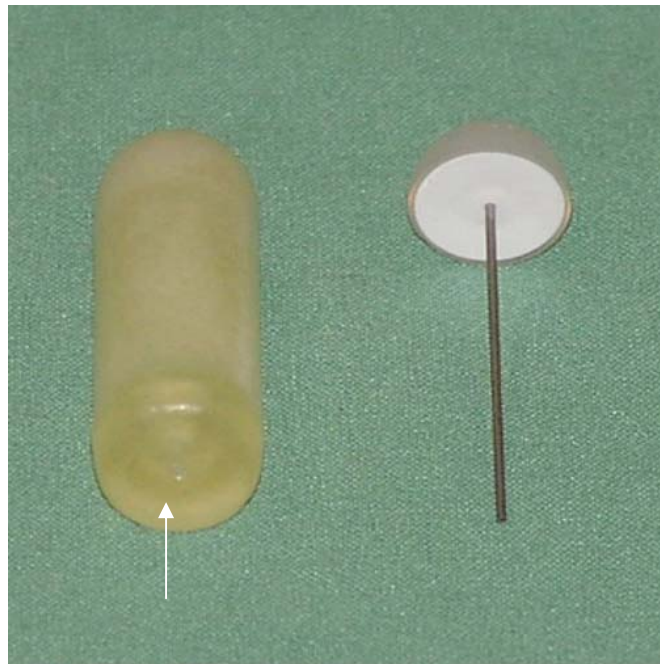


Abb. 6:

Komponenten der ALZET Osmotic Pump model 2ML4. Links ist der zu befüllende Zylinder mit der Einfüllöffnung zu erkennen, rechts die Verschlusskappe. Technische Daten, s. Text.



Abb. 7:

Füllung des Zylinders mit einer zum System gehörenden stumpfen Kanüle und 2ml Spritze.



Abb. 8:

Gefüllte und verschlossene Pumpe vor Implantation.

3.2.4. NO-Synthase-Inhibitor N ω -nitro-L-arginin-methylester-hydrochlorid

Der Hemmer der NOS, N ω -nitro-L-arginin-methylester-hydrochlorid ($C_7H_{15}N_5O_4 \cdot HCl$) (L-NAME), wurde in Pulverform über die Firma Sigma-Aldrich (Steinheim, Deutschland) bezogen. Die Lagerung erfolgte im Eisschrank bei mindestens -4 Grad Celsius. Die Kaninchen bekamen das Medikament in einer Dosierung von 10mg/kgKG/d gewichtsadaptiert nach gleichem Procedere wie beim Quinapril beschrieben.

3.3. Versuchstiere

Als Versuchstiere dienten männliche Kaninchen der Rasse „Weiße Neuseeländer“ mit einem Körpergewicht von mindestens $3,5$ kg. Lieferant der Tiere war die Firma Charles River, Holland. Für jede der sechs Serien wurden neun Kaninchen benötigt, die im weiteren Verlauf behandelt und operativen Maßnahmen unterzogen wurden. Die Haltung erfolgte in Einzelkäfigen mit einer Grundfläche von $0,8 \times 0,5$ Metern gemäß den geltenden rechtlichen Bestimmungen. Durch eine automatische Heizungsanlage mit Frischluftzufuhr wurde die Temperatur stets zwischen $18-22^\circ\text{C}$ gehalten. Die tägliche allgemeine Betreuung der Tiere wurde durch Tierpfleger des Instituts für Theoretische Chirurgie sichergestellt. Die Tiere

bekamen Standardfutter (Altromin®) und separat Wasser nach Belieben. Die chirurgische und postoperative Versorgung der Tiere erfolgte durch den Autor.

Im Mittel wurden die Tiere eine Woche vor dem eigentlichen Operationstermin geliefert. Hierdurch konnte eine tiergerechte Ruhe- und Anpassungsphase vor dem geplanten Eingriff erreicht werden. Die Dauer zwischen Implantation und Explantation des Venenbypass betrug 4 Wochen. Mit der Explantation wurden die Tiere medikamentös durch Pentobarbiturat ad exitum gebracht.

3.4. Operatives Vorgehen

3.4.1. Narkoseführung, Kontrolle der Vitalparameter und Schmerzlinderung

Die Narkose der Versuchstiere erfolgte in Anlehnung an Untersuchungen zur Langzeitanästhesie beim Kaninchen von Troitzsch et al. (1996). Im vorliegenden Fall konnte jedoch durch ein modifiziertes Regime auf eine Inhalationsnarkose bei gleich guten Ergebnissen zugunsten einer ersten subkutanen (s.c.) und weiterer intramuskulären (i.m.) Applikationen verzichtet werden. Hierfür wurde unter sterilen Bedingungen eine Mischung des Tieranaesthetikums Rompun® 2% (Wirkstoff: Xylazinhydrochlorid; Fa. Bayer Vital GmbH, Leverkusen) und des Analgetikums Ketamin 500mg (Wirkstoff: Ketaminhydrochlorid; Fa. CuraMED Pharma GmbH, Karlsruhe) im Verhältnis 6:4 zusammen in eine 10ml Spritze aufgezogen und vermischt. Die Tiere wurden in ihren Käfigen durch eine zweite Person fixiert und mit einer s.c. Injektion von 5-6 ml Narkotikum in die Hautfalte zwischen Ober- und Unterschenkel des Hinterlaufs in Analgosedierung versetzt. Nach ca. 10 Minuten Einwirkzeit konnte das Kaninchen sediert aus dem Käfig genommen werden. In o.g. Dosierung war der eigene Atemantrieb während der gesamten Operation in ausreichendem Masse sichergestellt.

Es folgte die Lagerung auf dem Op-Tisch in Rückenlage und die Fixation. Das Tier wurde dann an beiden Vorderläufen und dem linken Hinterlauf über intrakutane Elektroden eines Hellige® EKG-Monitors an die Kreislaufüberwachung angeschlossen. Vor Hautschnitt wurden nochmals 1-2 ml Narkosemittel verabreicht und zur Sicherung der Narkosetiefe der Zwischenzehenreflex und die Schmerzreaktion im Ohrmuschelbereich getestet. Der Verlauf der Aufwachphase konnte an den Parametern Herzfrequenzanstieg und Schnüffelpbewegungen der perioralen Muskulatur festgestellt werden. Alle Tiere wurden schlafend und vor

Auskühlung geschützt in saubere Käfige verlegt. Schmerzfreiheit wurde dann für weitere vier Tage durch den Zusatz von Tramal[®] (Tramadolhydrochlorid, Mundipharma, Limburg/Lahn, Deutschland) zum Trinkwasser sichergestellt.



Abb. 9:

Kaninchen vor OP-Beginn zur Implantation mit steril gerichteten Instrumenten. Im Hintergrund der Hellige[®]-EKG-Monitor zur Kreislaufüberwachung.

3.4.2. Operationsbericht und Nachsorge

Nach sorgfältiger Desinfektion des Operationsgebietes am Hals, erfolgte die ca. 3 cm lange oberflächliche Hautinzision in der linken Halsloge 0,5cm unterhalb und lateral des Angulus mandibulae. Nach vorsichtiger Spaltung des subcutanen Bindegewebes, konnte ein 20 mm langes Stück der oberflächlich liegenden Vena jugularis externa präpariert und abgesetzt werden. Das Venentransplantat wurde in einer sterilen Kulturschale mit physiologischer Kochsalzlösung gespült und die Spülflüssigkeit verworfen. Im Falle einer decoy-Versuchsreihe wurden in eine weitere Spritze mit 1,5 ml NaCl-Lösung 50µl der Decoy

Substanz gegeben und vermischt. Auch hiermit wurde das Transplantat gespült und dann für 60 Minuten abgedeckt in der Lösung belassen.

Es erfolgte die weitere chirurgische, möglichst stumpfe Präparation durch das Binde- und Fettgewebe. Die Arteria carotis communis zeigte sich mit dem Nervus vagus in der Tiefe liegend in enger Beziehung zum Musculus sternocleidomastoideus und der Trachea. Die Arterie wurde vorsichtig mobilisiert.

Nach Ende der Inkubationszeit erhielt das Tier einmalig 200 IU/kg/KG Heparin appliziert. Danach wurde die Arteria carotis communis distal und proximal der Präparation mittels entferntbarer Gefäßclips abgeklemmt. Das Venentransplantat konnte in Zwei-Faden-Technik mit Prolene-Fäden 8-0 End-zu-Seit auf die Arterie anastomosiert werden. Die Gefäßclips wurden entfernt und es zeigte sich die Füllung des Bypasses. Anschließend wurde die Arterie zwischen den Anastomosen unterbunden. Der Fluss konnte visuell und palpatorisch durch Pulsationen des Venenbypass kontrolliert werden. Eventuelle Sickerblutungen aus dem Anastomosenbereich wurden durch Auflage eines Kollagenvlies zum Stehen gebracht. Zum Schutz wurde das Transplantat und die Arterie von einer Gore-Tex® Membran umschlossen. Danach erfolgte der schichtweise Wundverschluss.

Abschließend erhielten die Tiere zum Schutz vor Kratzverletzungen für 36 Stunden eine Halskrause aus Gips. Diese wurde nach vorheriger Mullumwicklung mit einer Windung locker um den Hals gelegt und anmodelliert. Die Tiere waren hierdurch nicht bewegungs- und atmungseingeschränkt und konnten weiterhin problemlos trinken. Die Inspektion der Wundverhältnisse erfolgte täglich und wurden bei Verunreinigungen mit Betaisadon® Lösung (Fa. Mundipharma, Limburg / Lahn, Deutschland) vorsichtig gereinigt. Jedes Kaninchen erhielt unmittelbar postoperativ eine gewichtsadaptierte „single-shot“ Antibiose mit Tardomycel Compositum® (Fa. BayerVital, Leverkusen, Deutschland).

Tiere, die mit einer Minipumpe versorgt werden mussten, wurden wie o.g. narkotisiert und auf dem Bauch gelagert. Nach Desinfektion des perivertebralen Fells im Bereich der Schulterblätter, wurde in der Medianlinie eine ca. 10mm breite Inzision gesetzt. Durch stumpfe Präparation wurde paravertebral eine Tasche angelegt und die Pumpe implantiert. Abschließender Wundverschluss mittels 2-0 Vicryl Einzelknopfnähten.

Bei allen Kaninchen wurde der transplantierte Bypass nach 28 Tagen explantiert. Hierzu erhielt das Tier die o.g. Narkose und OP-Vorbereitung. Nach Desinfektion wurde zuerst mit einem Schnitt auf der kontralateralen Seite die Vena jugularis externa als Kontrolle entnommen. Danach wurde auf der voroperierten Seite durch Schnitt und Präparation der venöse Bypass dargestellt und en block mit der überbrückten Arterie entfernt. Die Präparate wurden auf kleine Korkplatten fixiert und in Formalin-Lösung bis zur histologischen Aufarbeitung konserviert. Die Wunden wurden provisorisch verschlossen. Durch intrakardiale Injektion von Pentobarbital wurden die Tiere ad exitum gebracht. Die bei einigen Tieren implantierte Mini-Pumpe wurde ebenfalls operativ entfernt. Die Entsorgung der Kadaver erfolgte zentral über die Tierversuchsanlage.

3.4.3. Fotodokumentation des operativen Eingriffs

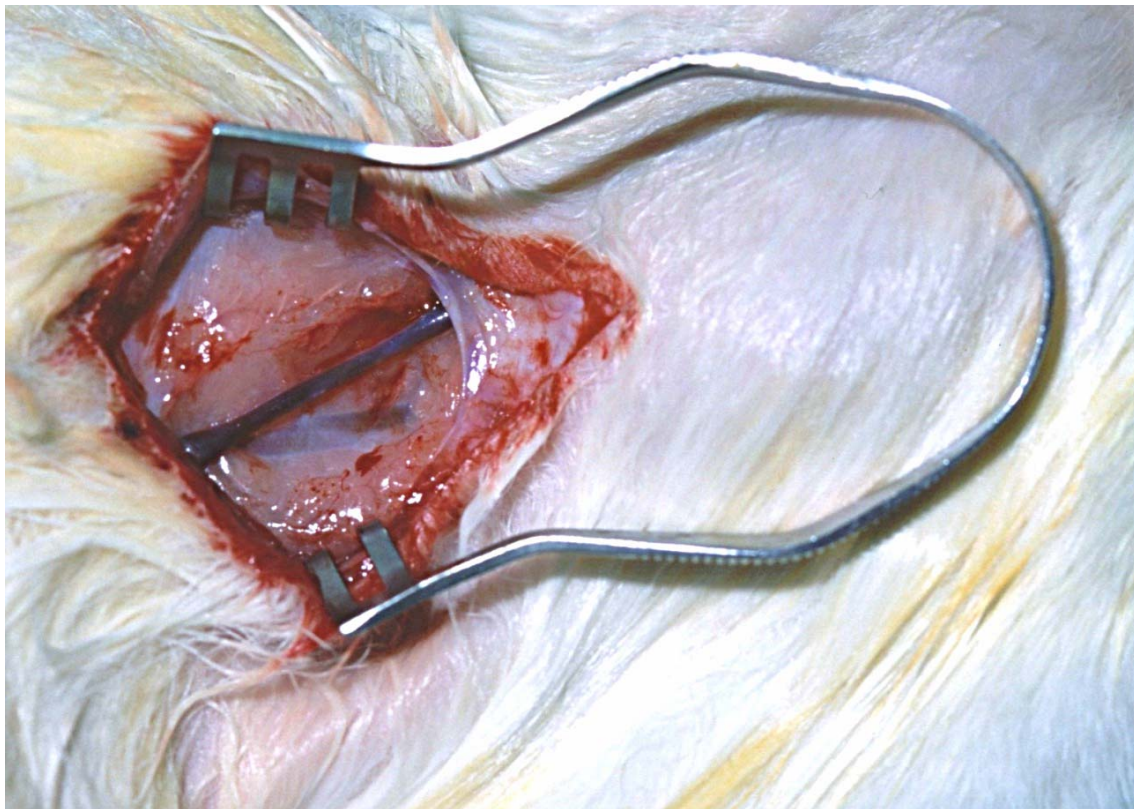


Abb. 10:

Komplette Freilegung der linksseitigen Vena jugularis externa von Bindegewebe und Vorbereitung der Entnahme. Am distalen und proximalen Ende erfolgte der Verschluss mit je einem Titan-Clip (nicht abgebildet).

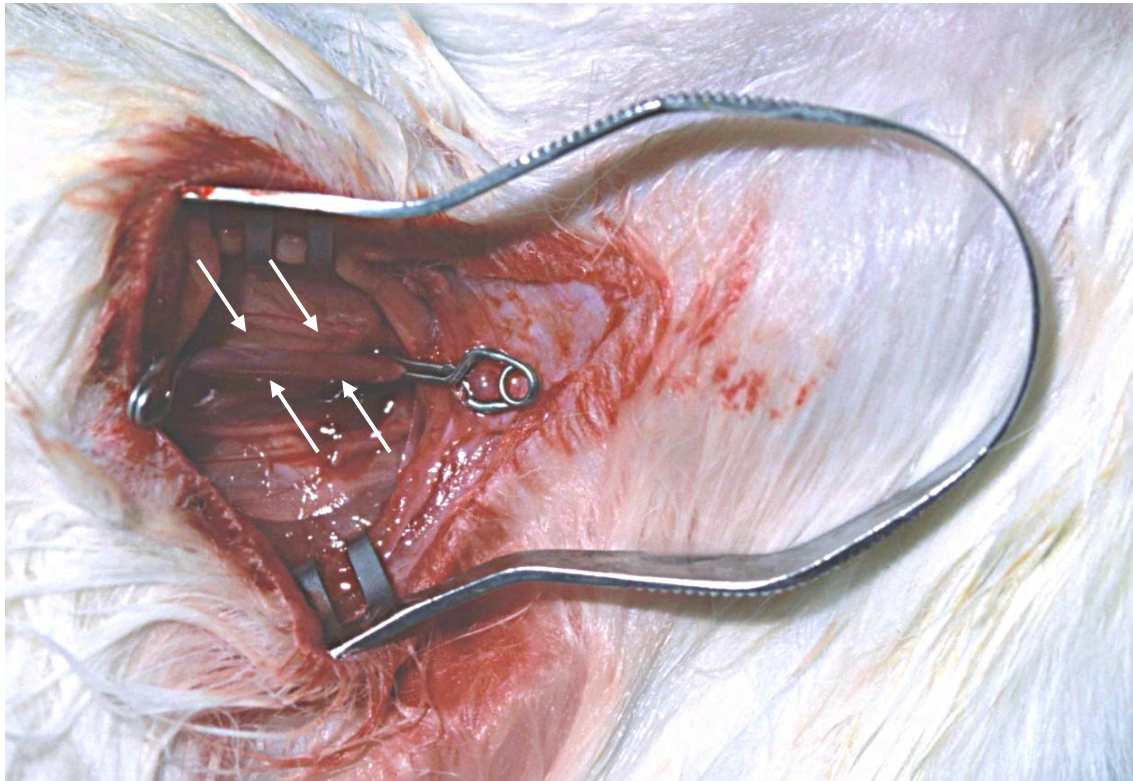


Abb. 11:

Freilegung der linksseitigen Arteria carotis interna in den paratrachealen Weichteilen. Das Gefäß wurde vorbereitend zur Anastomosierung mit zwei Gefäßclips proximal und distal verschlossen. Die freigelegte Gefäßlänge beträgt entsprechend dem Hautschnitt ca. 2 cm.

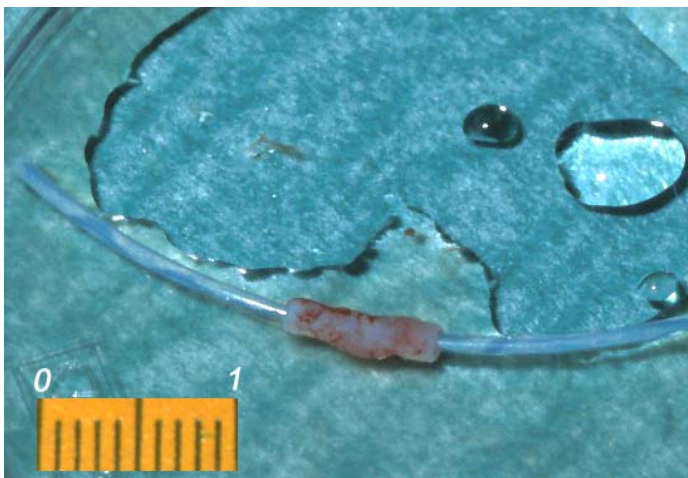


Abb. 12:

Gespültes Venentransplantat nach Entnahme. Zur besseren Darstellung erfolgte hier das Aufziehen auf einen Plastikmandrin. Zur Decoy-Behandlung befand sich das Transplantat in entsprechender Lösung abgedeckt in einer Petrischale bei Raumtemperatur.

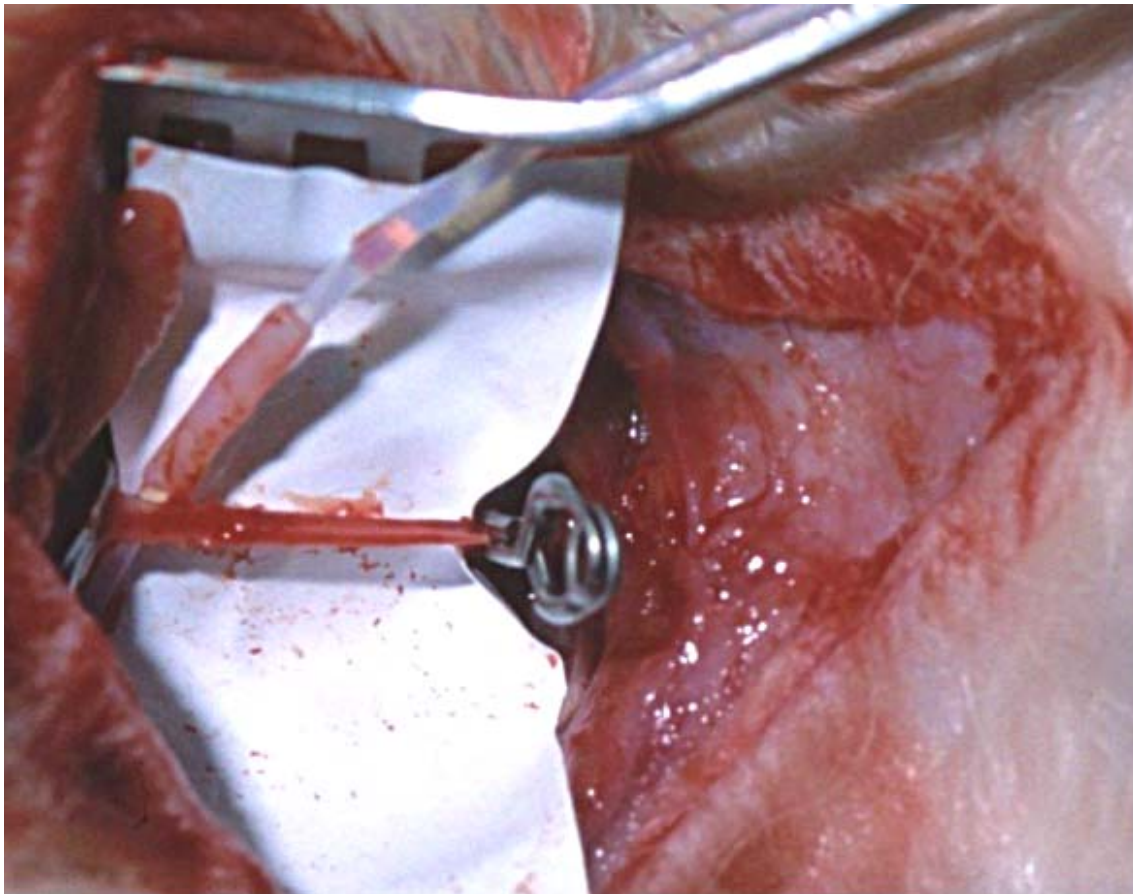


Abb. 13:

Ausgangsposition von Bypass zu Arterie vor Beginn der distalen Anastomosierung. Der Außendurchmesser der Arterie beträgt 1.8-2 mm. Die Vene ist auf einen an beiden Enden abgerundeten Kunststoffmandrin gezogen. Zur Kontrastverstärkung und zur späteren Ummantelung wurde ein individuell zurechtgeschnittener Gore-Tex®-Patch unter die Arterie gezogen.

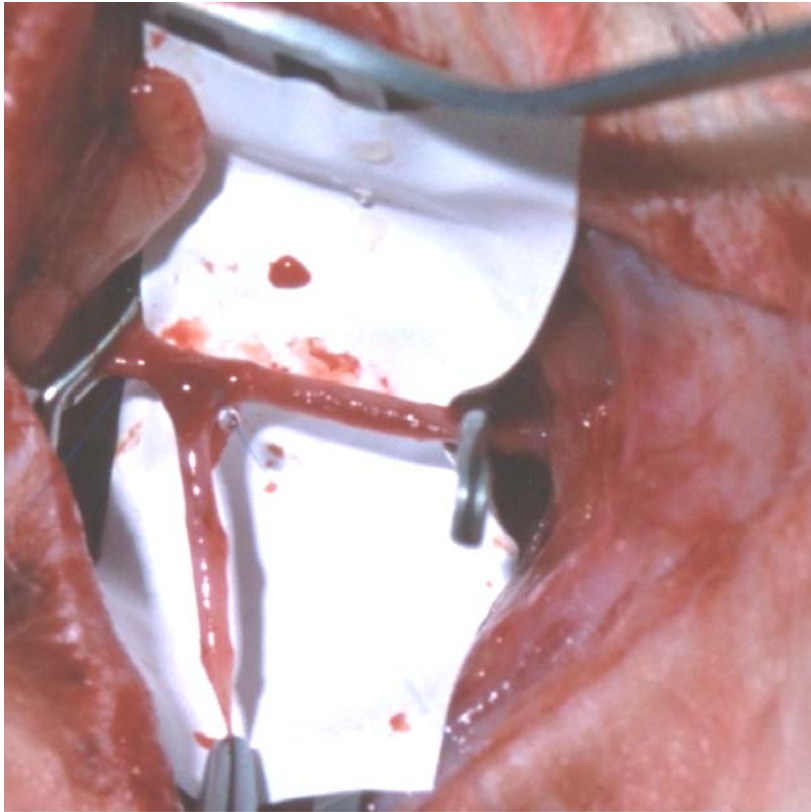


Abb. 14:

Anlegen der distalen Anastomose mit zwei je halbseitig fortlaufenden Nähten (Prolene 8-0).

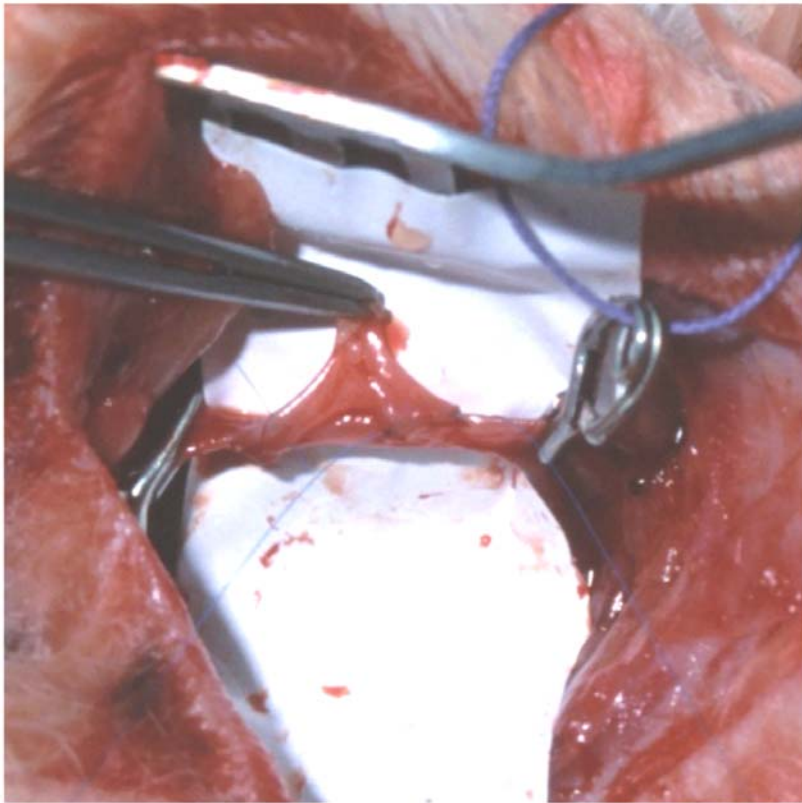


Abb. 15:

Anlegen der proximalen Anastomose mit zwei je halbseitig fortlaufenden Nähten (Prolene 8-0).

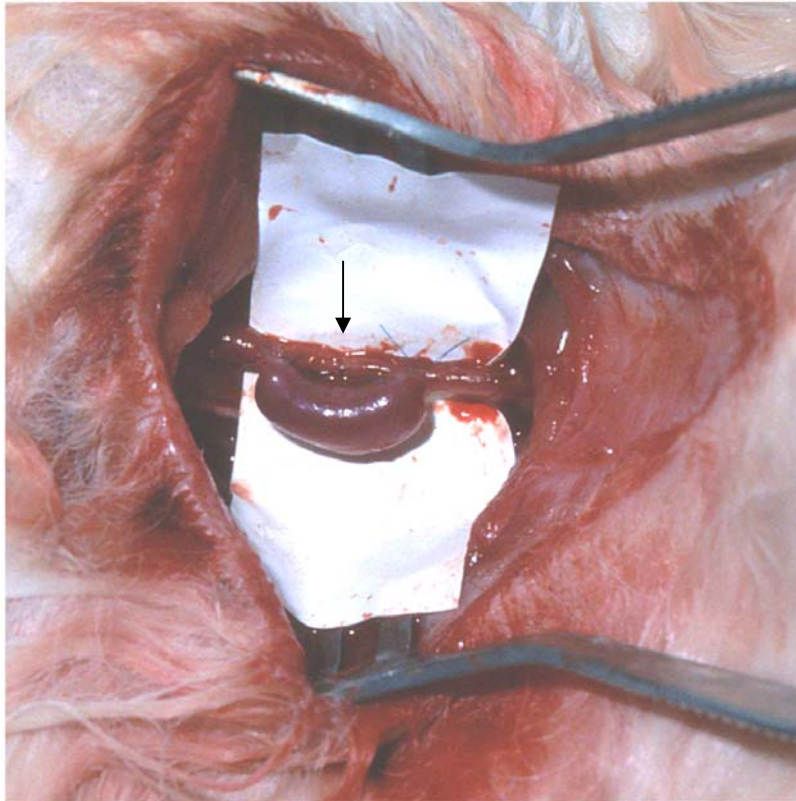


Abb. 16:

Ballonierter venöser Bypass auf die Arteria carotis interna. Die hier erkennbare Ligatur der Arterie in der Mitte beider Anastomosen wurde zugunsten zweier Ligaturen, die jeweils näher an der Anastomose lagen, korrigiert. Vorher wurde der einwandfreie Durchfluss sowohl ante- als auch retrograd kontrolliert.

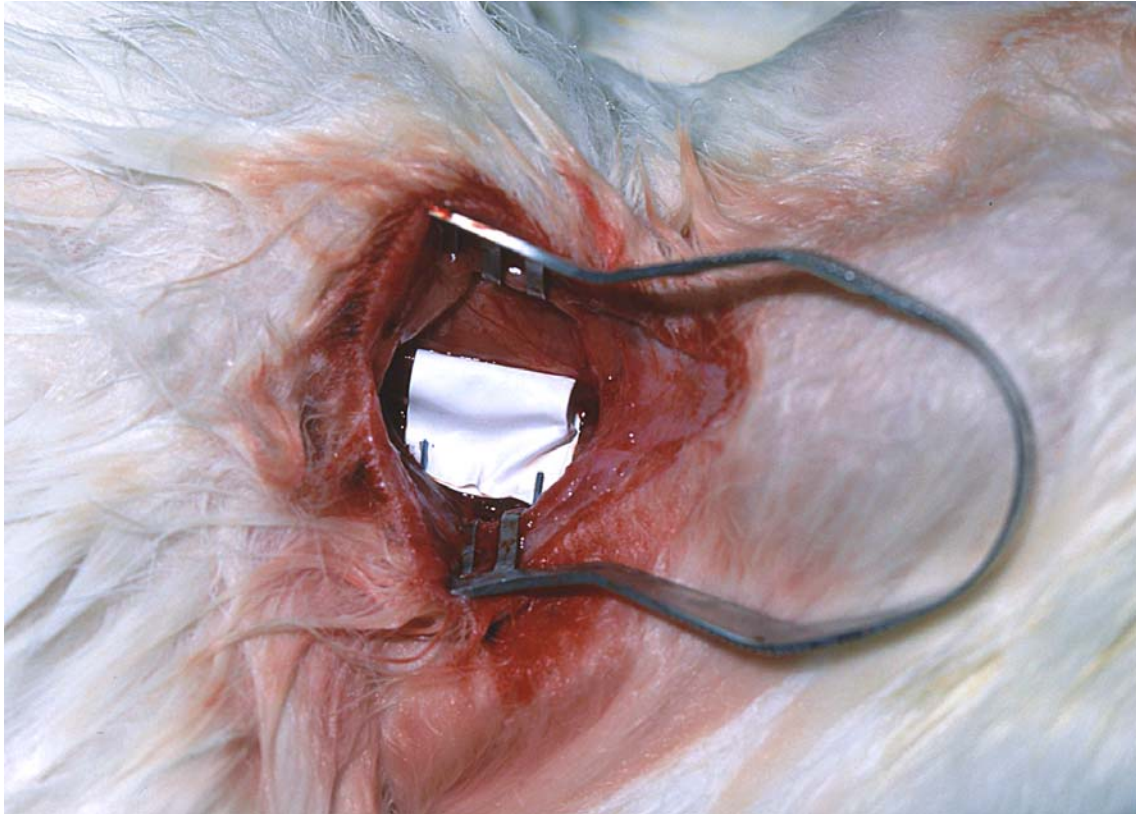


Abb. 17:

Zum Schutz vor Verwachsungen und Kompression der Anastomosen wurde der Gore-Tex[®]-Patch locker um die Gefäße gelegt und mit zwei Titan-Clips an den äußeren Enden zusammengehalten.

3.4.4. Materialien - Implantation

Pro operiertem Versuchstier waren für die Implantation folgende Instrumente und Verbrauchsmaterialien notwendig:

Instrumentarium

Scheren unterschiedlicher Grösse und Feinheit

Einmal-Skalpell, Nr.10

Anatomische und chirurgische Pinzette

Zwei Nadelhalter, davon ein Federnadelhalter

Zwei entfernbare Gefäßclips mit Bedieninstrument

Titan-Gefäßclips, permanent

Feine, gebogene und gerade Klemmen

Verbrauchsmaterial

Präpariertupfer und Kompressen

Fäden Stärke 8-0 mit Nadel

Fäden Stärke 2-0 mit Nadel

Zellkulturschale, Durchmesser 3 cm

2x3 cm sterile Gore-Tex® Membran (Fa. W.L. Gore, Flagstaff, AZ, USA)

Kollagenvlies, 5x1 cm (Fa. Tachocomp)

Gläserne 100µl Spritze mit Kanüle

Kanülen für Injektionszwecke

Sterile 10 ml Spritze

Sterile 2 ml Spritze

Eine Braunüle

Verbandwatte und Verbandgips, 5 cm Breite

Steriles OP-Tisch Abdecktuch

Sterile Handschuhe

Zusatzausrüstung

OP-Kleidung, Gesichtsschutz

Lupenbrille

Hellige® EKG-Monitor mit intrakutanen Stichelektroden und Verbindungskabeln

Alzet osmotic pump model 2ML4 (ALZA Corporation, Palo Alto, CA, USA)

Medikamente

Ketanest® Analgetikum (Fa. CuraMED Pharma GmbH, Karlsruhe)

Rompun® Tieranaesthetikum (Fa. BayerVital GmbH, Leverkusen)

Tardomycel Compositum® Antibiotikum (Fa. BayerVital GmbH, Leverkusen)

20 ml Ringer®-Lösung (Fa. Fresenius AG, Oberursel)

Desinfektionsmittel

Braunoderm® (Fa. Braun, Melsungen)

Sterillium® Händedesinfektion (Fa. Bode Chemie, Hamburg)

SecuSept® Instrumentensterilisation

3.4.5. Materialien - Explantation

Für die Explantationen der Veneninterponate wurden pro operiertem Kaninchen folgende Materialien benötigt:

Instrumentarium

Scheren unterschiedlicher Größe und Feinheit

Einmal-Skalpell, Nr.10

Anatomische und chirurgischen Pinzette

Zwei Nadelhalter, davon ein Federnadelhalter

Zwei entfernbare Gefäßclips mit Bedieninstrument

Titan-Gefäßclips, permanent

Feine, gebogene und gerade Klemmen

Verbrauchsmaterial

Präpariertupfer und Kompressen

Zellkulturschale, Durchmesser 3 cm

sterile 10ml Spritze

eine Brauntüle

unsteriles OP-Tisch Abdecktuch

unsterile Latex- Handschuhe

Zusatzausrüstung

zwei gläserne Präparategefäße mit Schraubverschluss

zwei Korkplättchen von 1x1 cm Größe

Stecknadeln

beschreibbare Aufkleber, Kugelschreiber

OP-Kleidung, Gesichtsschutz

Lupenbrille

Hellige® EKG-Monitor mit intrakutanen Stichelektroden und Verbindungskabel

Medikamente

Ketanest® Analgetikum (Fa. CuraMED Pharma GmbH, Karlsruhe)

Rompun® Tieranaesthetikum (Fa. BayerVital GmbH, Leverkusen)

Pentobarbital® (Fa. Berlin-Chemie, Berlin)

Desinfektionsmittel

Braunoderm® (Fa. Braun, Melsungen)

Sterillium® Händedesinfektion (Fa. Bode Chemie, Hamburg)

SecuSept® Instrumentensterilisation

Chemikalien

ca.100 ml Formalin-Lösung 4%ig (eigene Herstellung)

3.5. Histologische Aufarbeitung

Die Gewinnung der histologischen Schnitte erfolgte vom proximalen Anteil des Transplantats, jeweils 2-3mm von der Anastomose entfernt, da dies der Ort maximaler Belastung, Atherosklerosegefährdung sowie die Hauptprädispositionsstelle für eine Intimahyperplasie ist (Malek, et al. 1995). Das perfusionsfixierte und auf ein Korkplättchen aufgespannte Präparat wurde binnen 48 Stunden entsprechend senkrecht zur Längsachse vorgeschritten und in Paraffin eingebettet. Pro Präparat/Tier wurden mehrere Dünnschnitte (3-5µm) gewonnen und gefärbt, von denen allerdings aus technischen Gründen jeweils nur eins zur Auswertung herangezogen werden konnte. Durch das nahe liegende Nahtmaterial kam es in der Mehrzahl der Fälle beim schichtweisen Aufbereiten der Mikroschnitte zu Zerreissungen der Präparate. An jedem Präparat wurde an 12 Messpunkten im gleichen Bogenmass jeweils die Intimadicke bestimmt. Die Mittelwerte der pro Versuchstier ermittelten Meßpunkte wurden in der jeweiligen Versuchsgruppe zusammengefasst. Somit wurde die Gruppenzugehörigkeit der Probanden und die Zuordnung der histomorphometrischen Meßpunkte zum Versuchstier gesichert. Die weitere Bearbeitung der Parameter erfolgte nach Ausschluss einer Normalverteilung (Kolmogorov-Smirnov-Test) durch parameterfreie Analyseverfahren (siehe 3.7.). Die Auswertung erfolgte jeweils verblindet und wurde durch einen Fachpathologen kontrolliert (AS). Messungen von Media und Adventitia wurden entsprechend der Fragestellung nicht durchgeführt.

3.5.1. Van Giesson und Haematoxylin-Eosin Färbung

Die Aufbereitung und Färbung der Schnitte erfolgte semiautomatisiert nach Standardverfahren für die van-Giesson- und die Haematoxylin-Eosin Färbung. Es wurden Dünnschnitte von 3-5µm verwendet.

3.5.2. Immunzytochemische Färbung für den Endothelin A- und B-Rezeptor-Antikörper

Für die Aufbereitung wurden paraffin-fixierte Dünnschnitte (3-5µm) verwendet, die eine Stunde bei 60°C getrocknet wurden. Vor der Färbung erfolgte das Entparaffinieren mittels Xylol, Alkohol und Aqua dest. mit anschließender Mikrowellen Vorbehandlung für 25 min. in einer Milestone TT-Mega Mikrowelle in Tris/EDTA Puffer (pH 9.0). Danach wurde 15 min. unter fließendem Leitungswasser gekühlt und abgespült. Vor der semiautomatisierten

Färbung mittels Shandon Sequenzer wurden die Schnitte mit PBS auf Coverplates aufgespannt. Zuerst erfolgte die Inkubation in Normalserum vom Pferd (Fa. Vector, Burlingame, CA, USA) 1:10 verdünnt in 2% Milchpulver/PBS (15 min) und danach für eine Stunde mit einem anti-ET_A- und anti-ET_B-Rezeptor Primärantikörper 1:200 verdünnt in ebenfalls 2% Milchpulver/PBS (Endothelin-A-Rezeptor PAb, No: ALX-210-507-C250, L07169/H; Endothelin-B-Rezeptor PAb, No: ALX-210-506-C250, L07168/F; Fa. Alexis Biochemicals GmbH, Grünberg, Deutschland). Danach erneute Waschung in reinem Milchpulver/PBS und anschließender Inkubation in biotinyliertem anti-Schaf Serum (Fa. Vector, Burlingame, CA, USA) (1:100) für 30 min. Es erfolgte das erneute Abspülen von überschüssigem Serum mittels PBS und die Färbung durch den Avidin-Biotinylierten-Enzym-Complex (ABC-Färbung) (Fa. Vector, Burlingame, CA, USA). Für diese peroxidase-gebundene Reaktion diente eine horseradish peroxidase (HRP). Die Entwicklung wurde mittels DAB (Diaminobenzidin; Konzentration: 50µg in 50ml 0,05m Tris/HCl-Puffer [pH 7,4] plus H₂O₂) durchgeführt. Nochmaliges Abspülen mit Leitungswasser und Aqua dest. und Gegenfärbung mit Hämalaun. Nach Bläuen mit Leitungswasser und Waschung in aufsteigender Alkoholreihe sowie Xylol, konnten die Schnitte abschließend mit Eukitt eingedeckt werden. Die Zellen mit den nachzuweisenden Antikörper stellten sich braun dar (DAB).

3.5.3. Histologische Begutachtung und Vermessung

Die Schnitte wurden mit einem Mikroskop der Firma Leica, Modell DM RXE begutachtet. Über eine angeschlossene Kamera (Sony 3CCD) wurden die Bilder auf eine Bildbearbeitungseinheit der Fa. Leica, Modell Quantimed Q600S übertragen und am integrierten PC vermessen. Betriebssystem für die Software war Microsoft Windows 3.1®. Für die semiquantitative Bestimmung der immunzytochemischen Anfärbbarkeit des ET_A- und ET_B-Rezeptors wurde in Anlehnung an Wülfing (*Wülfing P et al. 2003*) ein Score von 0-3 gebildet: Grad „0“: keine Anfärbbarkeit, Grad „1“: schwache Anfärbbarkeit, Grad „2“: moderate Anfärbbarkeit, Grad „3“: starke Anfärbbarkeit. Für Präparate mit einer Immuno-Anfärbbarkeit von Grad 2 und 3 wurde eine erhöhte Expression von ET_A-R und ET_B-R definiert. Die (unbehandelte) kontralaterale V. jugularis wurde als Negativkontrolle mitgeführt. Alle Schnitte wurden verblindet durch den Autor ausgewertet und durch eine Fachpathologin (AR) kontrolliert.

3.6. Datenauswertung

Die Erfassung der Messdaten erfolgte über das Microsoft-Programm Excel®. Mit diesem wurden ebenfalls alle Grafiken erstellt. Die statistischen Berechnungen wurden mit dem Programm SPSS für Windows durchgeführt. Als PC diente ein Notebook mit Pentium III 600 mHz – Prozessor.

3.7. Statistische Tests

Vor Prüfung der Signifikanz innerhalb der Stichproben bei kleinen Fallzahlen, wurde mittels des Kolmogorov-Smirnov-Tests eine Normalverteilung innerhalb der Gruppen ausgeschlossen, so dass für die weiteren Auswertungen der Kruskal-Wallis- bzw. der U-Test nach Mann-Whitney herangezogen wurde.

3.7.1. Kruskal-Wallis-Test

Für die statistische Auswertung wurde zum einen der Kruskal-Wallis-Test gewählt. Dieser parameterfreie Test eignet sich zur Prüfung der Signifikanz mehrerer unabhängiger Stichproben hinsichtlich ihrer zentralen Tendenz und ist auch bei kleinen Gruppengrößen anwendbar.

3.7.2. U-Test nach Mann-Whitney

Dieser parameterfreie Signifikanztest diente zur Prüfung der Hypothese, dass zwei unabhängige Stichproben aus derselben Grundgesamtheit stammen. Der Wert U gibt an, wie viele Werte der Stichprobe N_1 insgesamt jedem einzelnen Wert der Vergleichsstichprobe N_2 vorausgehen. Überprüft wird hierbei der Unterschied der zentralen Tendenz. Der Test wurde als post-hoc-Test bei kleinem Kollektiv eingesetzt.

4. Ergebnisse

4.1. Anzahl der operierten Kaninchen

Insgesamt wurden 51 Kaninchen der Rasse „Weiße Neuseeländer“ operiert. Hiervon überlebten 48 Tiere bis zur Explantation und fanden in der Auswertung Berücksichtigung. Ein Tier verstarb intraoperativ und ein Tier in der unmittelbaren postoperativen Phase durch plötzlichen Herz-Kreislaufstillstand. Ein Kaninchen musste bei dauerhafter Nahrungsverweigerung und Infektion ad exitum gebracht werden. Die Explantation wurde im Allgemeinen nach 28 Tagen durchgeführt.

4.2. Narkoseprotokoll

Nach Sedierung und Analgesie sowie Einhaltung einer Ruhephase erfolgte der Anschluss der EKG-Elektroden. Die hierdurch ermittelte Ausgangsherzfrequenz wurde, neben dem Lid- und Ohrblasreflex (siehe *Troitzsch D et al. 1996*) zur Steuerung der Narkose benutzt. Orientierend für die Narkosetiefe war der Herzfrequenzanstieg nach Hautschnitt. Die Grundfrequenz der Tiere lag bei ca. 110 Schlägen pro Minute. Bei einem Frequenzanstieg über 160 Schlägen/Minute und einer Reflexauslösung, erfolgte eine Nachinjektion des Narkotikums. In sechs Fällen wurde dies notwendig.

4.3. Gruppenvergleiche

4.3.1. Tiere mit medikamentösem Behandlungsregime vs. Kontrolle

In einem ersten Vergleich wurden jeweils drei Gruppen gebildet, deren Tiere nach der Bypassoperation die Medikamente a) Quinapril (QP), b) Quinapril *und* L-Nitroarginin-Methylester (L-NAME) und c) Quinapril *und* Icatibant erhielten. Die Anzahl der in die Auswertung einfließenden Tiere waren: n= 5 für (a) und jeweils n= 4 für (b) und (c). Verglichen wurden diese drei Gruppen mit einer Kontrollgruppe (n= 4), die nach der Bypassoperation kein Medikament erhielt. Die Intimadicken wurden in Mikrometern angegeben und aus zwölf Messpunkten pro Schnitt gemittelt (zirkulär im gleichen Bogenmaß).

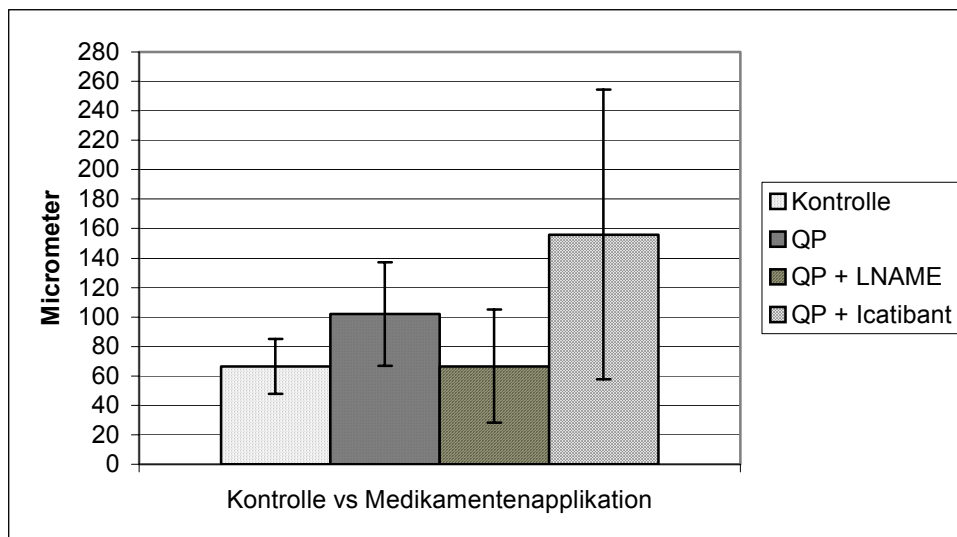


Abb. 18: Die Abbildung zeigt die gemessenen Intimadicken in Mikrometern (μm) als Mittelwert und Standardabweichung (SD) innerhalb der verschiedenen Untersuchungsgruppen. Es werden SD von 18,5 bis 98,3 μm erreicht. Der Vergleich der Ergebnisse zeigt keine signifikanten Unterschiede innerhalb der Gruppen.

4.3.2. Tiere mit decoyODN Applikation vs. Kontrolle

In diesem Vergleich wurden zwei Gruppen gebildet und die entnommenen Venengrafts jeweils einer anderen Inkubationsbehandlung vor Bypassstransplantation unterzogen. Von den acht pro Gruppe operierten Tieren wiesen je vier eine Bypassokklusion auf, so dass pro Gruppe vier Tiere in der statistischen Auswertung Berücksichtigung fanden. Die erste Behandlungsgruppe wurde einer Inkubation des Transplantats mit einem consensus dODN unterzogen und die zweite Gruppe erhielt eine Inkubationsbehandlung mit einem mutierten dODN. Verglichen wurden beide Gruppen mit einer Kontrollgruppe ($n=4$), deren Bypässe nicht behandelt wurden (identisch zur Kontrolle der Medikamentengruppe). Die Intimadicken wurden in Mikrometern angegeben und wie bereits ausgeführt, gemittelt.

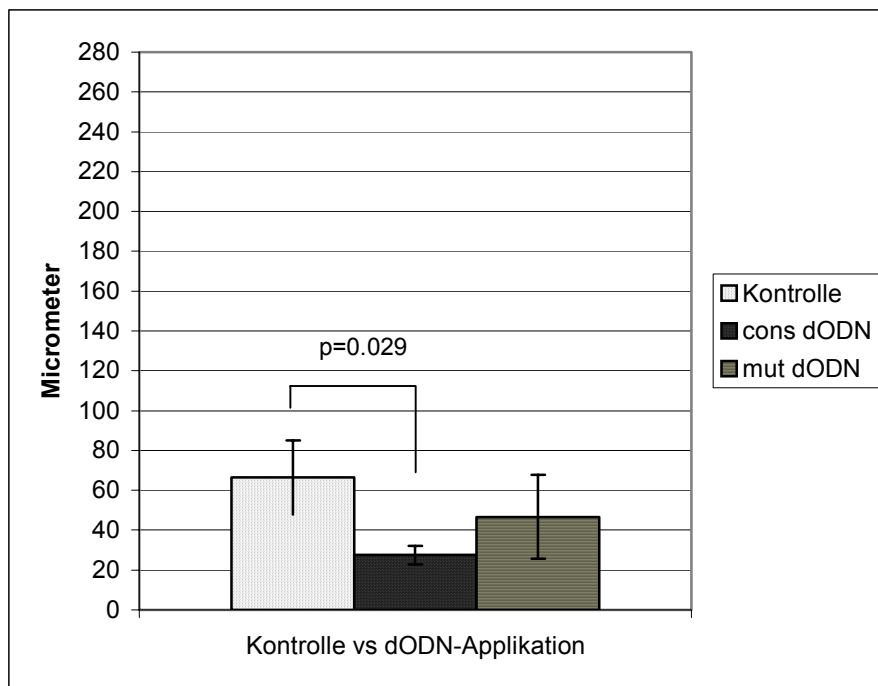


Abb. 19: Gezeigt sind die Mittelwerte der Intimadicken in Mikrometern (μm) der Kontrollgruppe vs. der Behandlungsgruppe mit consensus dODN und mutiertem dODN. Die Standardabweichungen betragen zwischen 4,6 und $21\mu\text{m}$. Der Vergleich zwischen der Kontrollgruppe und der consensus dODN-Gruppe ergibt einen signifikanten Unterschied von $p=0.029$.

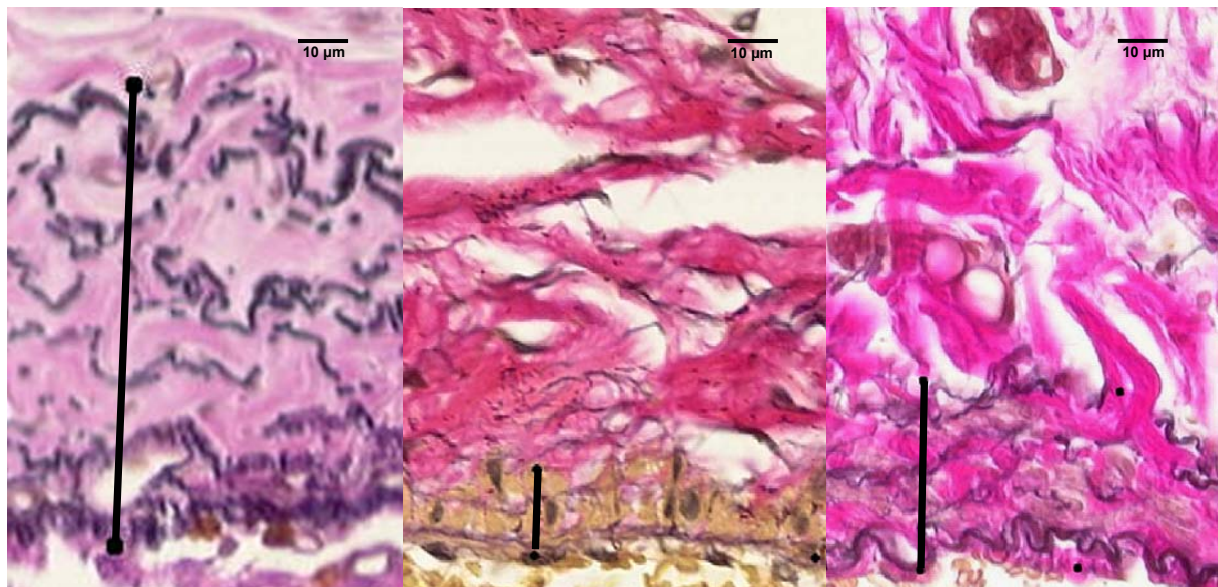


Abb. 20 Exemplarische Darstellung der Intimadicken (Einzelwerte). Links: Kontrollgruppe. Mitte: Behandlungsgruppe mit consensus dODN. Rechts: Behandlungsgruppe mit mutiertem dODN. Vergrößerung: $\times 100$.

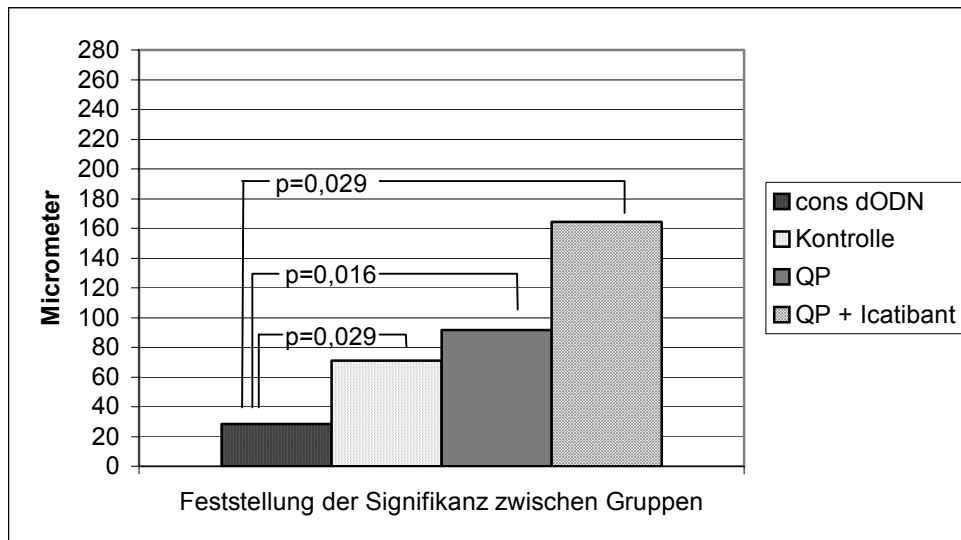


Abb. 21: Gegenüberstellung der medikamentösen und dODN-Behandlungsgruppen. Die consensus dODN-Behandlung zeigt sich als wirksame Methode zur Unterdrückung einer Intimahyperplasie. Die Werte nach Quinaprilgabe und der kombinierten Gabe von Quinapril und Icatibant liegen teils deutlich über den Kontrollwerten.

Im Vergleich aller untersuchten Behandlungsgruppen sowie der Kontrolle, konnten signifikante Unterschiede gezeigt werden. Der Kruskal-Wallis-Test als multipler Gruppenvergleich nichtparametrischer Daten ergab eine Signifikanz von $p = 0.022$. Die Werte des U-Test nach Mann-Whitney in der post-hoc Analyse sind der Abb. 20 zu entnehmen.

4.3.3. Bypassverschlussraten

Im Rahmen der Explantation wurde bei 25 von 48 Tieren ein offener Bypass mittels durchgängiger Perfusionsfixation festgestellt (52%). In jeder der untersuchten Gruppen waren mindestens die Hälfte der Transplantate durchgängig. In der Gruppe mit Quinapril Applikation zeigten fünf von acht Transplantaten ein freies Lumen. In die histologische Auswertung wurden ausschließlich Präparate mit eindeutig durchgängigem Lumen eingeschlossen.

4.3.4. Semiquantitativer Nachweis von Antikörpern gegen Endothelin-A und B-Rezeptoren im histologischen Präparat nach dODN-Behandlung

	consensus dODN		mutierter dODN		Kontrolle	
Endothelin-Rezeptor	A	B	A	B	A	B
Grad 0	--	--	--	--	--	--
Grad 1	4	4	2	--	4	4
Grad 2	--	--	2	--	--	--
Grad 3	--	--	--	4	--	--

Grad „0“: keine Anfärbbarkeit, Grad „1“: schwache Anfärbbarkeit, Grad „2“: moderate Anfärbbarkeit, Grad „3“: starke Anfärbbarkeit

Tab. 2: Darstellung der Ergebnisse zur semiquantitativen Detektion von ET_A- und ET_B-Rezeptoren durch entsprechende Antikörper in den jeweiligen Behandlungsgruppen. Pro Gruppe wurden jeweils 4 Tiere für den ET_A- und den ET_B-Rezeptor untersucht. Als (Negativ-) Kontrolle diente die unbehandelte Vene der Gegenseite (vgl. 4.3.7.).

Die Expression von Endothelin-Rezeptor-A- und B-Antikörpern konnte in den Gruppen mit decoyODN Behandlung in unterschiedlichem Ausmaß nachgewiesen werden. Hierzu wurden jeweils histologische Dünnschnitte von Bypässen der verschiedenen Gruppen verglichen.

4.3.5. Behandlung durch consensus dODN

Bei Präparaten dieser Gruppe lässt sich im Bereich des Endothels eine physiologische und im Bereich der glatten Muskulatur eine geringe Anfärbbarkeit für Endothelin A- und B-Rezeptor-Antikörper nachweisen. Der B-Rezeptor ist im direkten Vergleich aller untersuchten Schnitte quantitativ weniger stark nachweisbar als der A-Rezeptor. Zusammenfassend kann festgestellt werden, dass es zu einer Unterdrückung der Rezeptor-Expression für den Endothelin A- und B-Rezeptor gekommen ist.

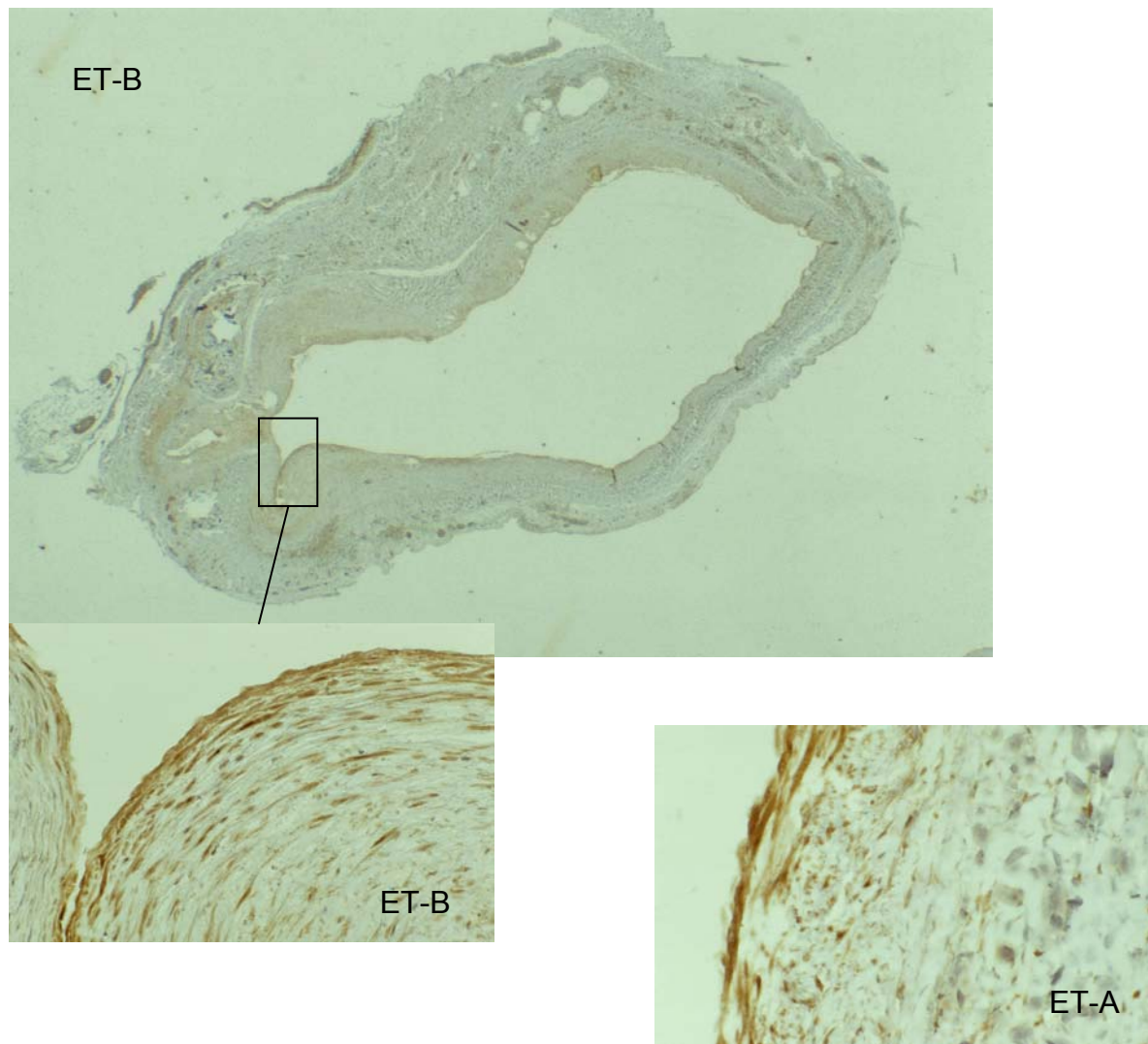


Abb 22: Das Bild zeigt exemplarisch Präparate der consensus dODN-Gruppe. Im oberen Bildanteil und unten links nach Anfärbung zur Darstellung des ET-B Rezeptors und unten rechts zur Darstellung des ET-A Rezeptors. Vergrößerung: Übersicht x10, Ausschnitt x40.

4.3.6. Behandlung durch mutierte dODN

Im Vergleich zur consensus dODN Gruppe ist in dieser Gruppe eine stärkere Ausprägung von Endothelin B-Rezeptoren sowohl in der Intima als auch in der Tunica media durch histologisch, semiquantitativen Nachweis zu belegen. Erklärbar ist dies durch die Mutation des dODN, die eine Downregulation des Rezeptors verhindert. Die Druck- und Schubbelastung des Blutfluss im venösen Bypassgrafts induziert eine ungehinderte Hochregulation der Endothelin-Produktion mit konsekutivem Anstieg der Rezeptordichte. Die Dichte des ET_A-Rezeptors liegt in ihrer Ausprägung unterhalb der ET_B-Rezeptor Dichte.

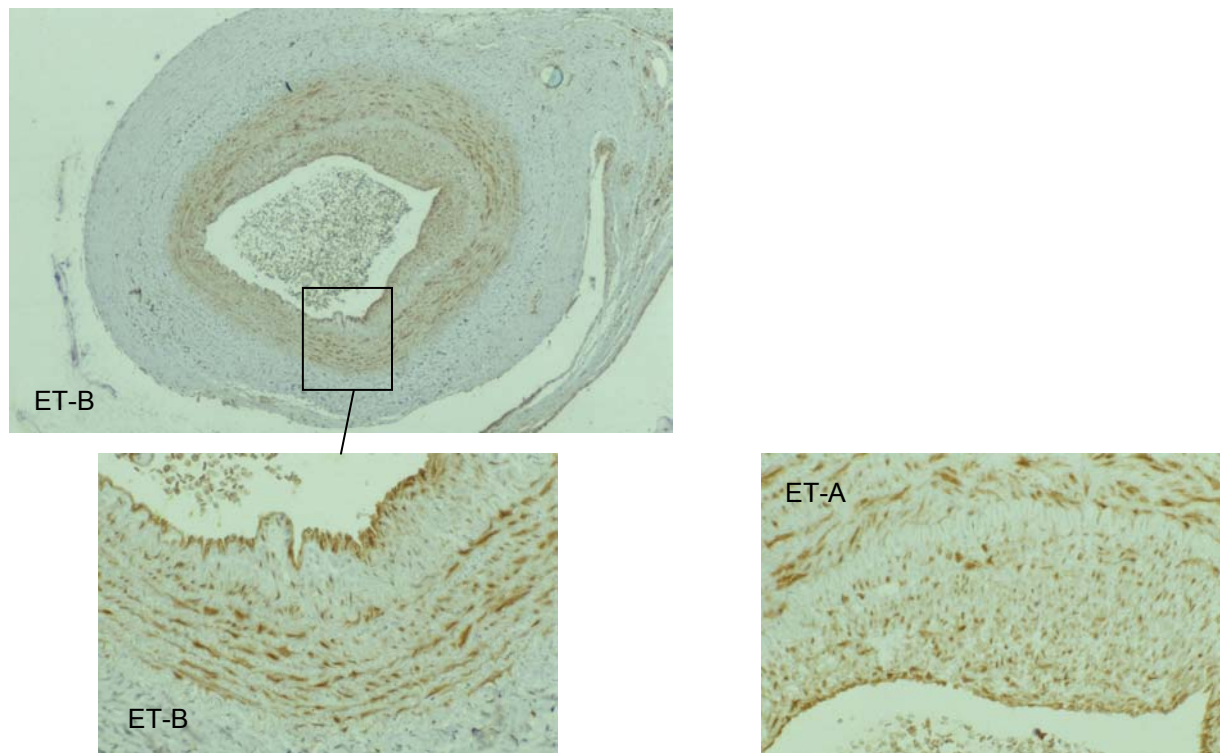


Abb 23: Das Bild zeigt exemplarisch Präparate der dODN-Gruppe mit mutiertem Decoy. Im linken Bildanteil die Darstellung des ET-B Rezeptors. Im rechten Bild die Situation nach Anfärbung zur Darstellung des ET-A Rezeptors. Vergrößerung: Übersicht x10, Ausschnitt x40.

4.3.7. Vene der kontralateralen Seite

Als (Negativ-) Kontrolle wurden die nicht behandelten und nicht transplantierten nativen Venen der Gegenseite ebenfalls mit dem Endothelin A- bzw. B-Rezeptor Antikörper inkubiert und untersucht. Es fand sich eine teils schwach angefärbte Endothelschicht neben einzelnen, länglichen glatten Muskelzellen unterhalb der Basalmembran, die ebenfalls angefärbt wurden. Darüber hinaus fanden sich keine Zellen mit weiteren Anhaltspunkten für eine Expression von Endothelin und der begleitenden Hochregulation des Endothelin-Rezeptors in dem Ausmaß wie in den venösen Transplantaten gesehen.

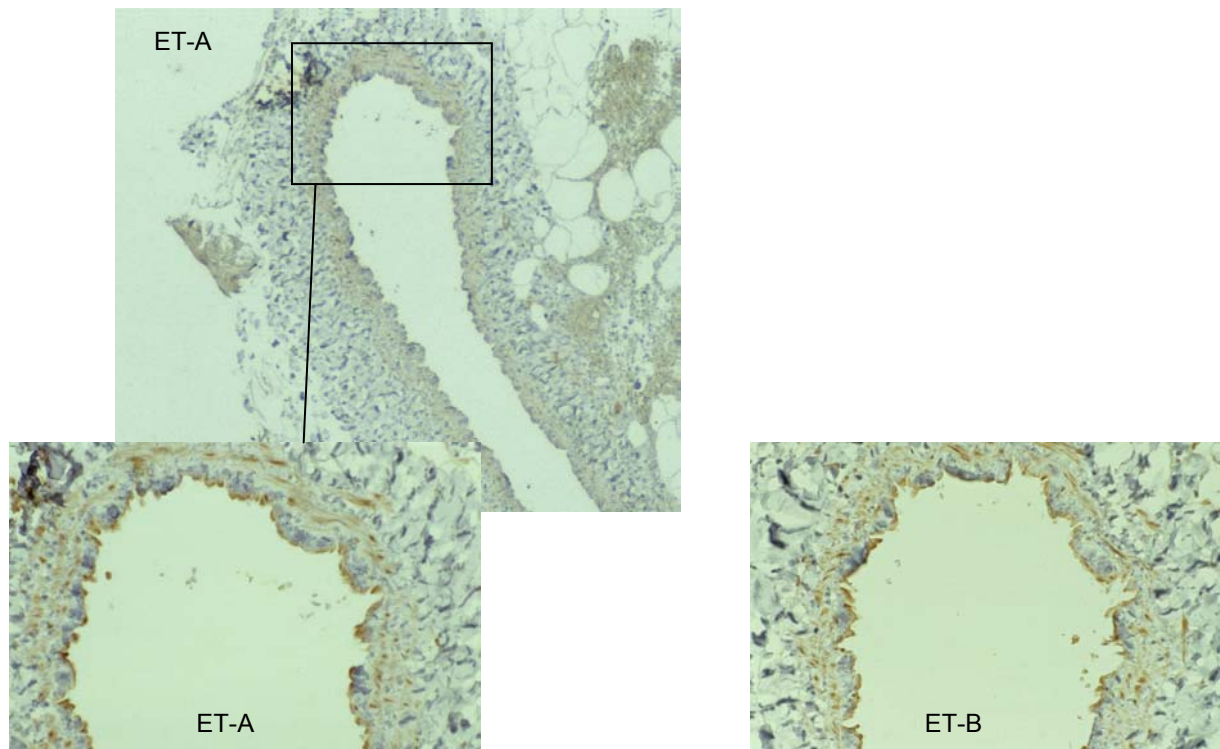


Abb 24: Die Bilder zeigen exemplarisch Präparate der Kontrollgruppe. Im linken Bildanteil findet sich die Darstellung des ET-A Rezeptors. Im rechten Bild ist die Darstellung des ET-B Rezeptors zu sehen. Vergrößerung: Übersicht x10, Ausschnitt x40.

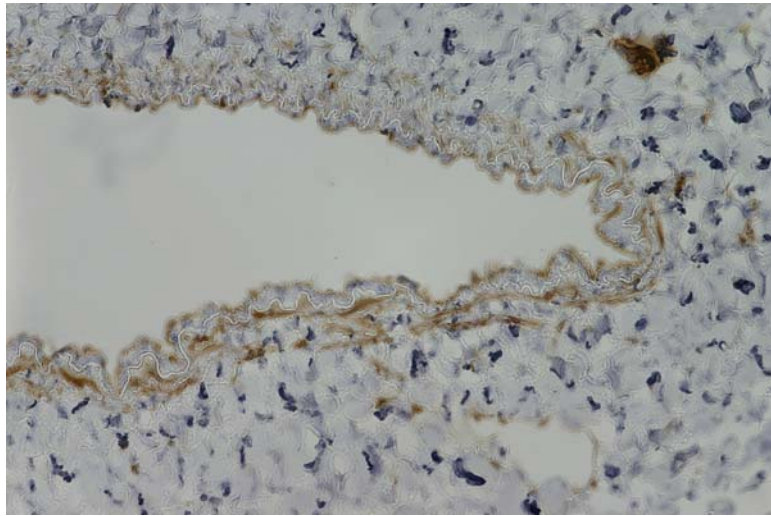


Abb. 25:

Native Vene. Erkennbar ist das Endothel und vereinzelte, länglich dem Gefäßverlauf folgende glatte Muskelzellen. Zu erkennen ist die transparent erscheinende Basalmembran unterhalb des Endothels, die dieses deutlich von den glatten Muskelzellen abgrenzt. Das Gefäß ist von gallertartigem Weichgewebe umgeben (dunkle Färbeartefakte durch Summation der Schichten bei Einriß durch Dünnschnitt). Braunfärbung des ET_B-R-Antikörpers mittels DAB. Gegenfärbung durch Hämlaun. Vergrößerung: x40.

4.3.8. Zusammenfassung der Ergebnisse der immunhistologischen Untersuchungen zur Expression von Endothelin-A und Endothelin-B- Rezeptoren

Aus den Beobachtungen der semi-quantitativen histologischen Untersuchung auf ET_A- und ET_B-Rezeptor-Antikörper können folgende Schlüsse gezogen werden:

- Das verwendete consensus dODN bewirkte eine Downregulation der ET_B-Rezeptorexpression.
- Infolge der consensus dODN Behandlung war in geringem Maße eine Rest-Expression beider Rezeptoren noch nachweisbar.
- Der Endothelin-A und Endothelin-B-Rezeptor lässt sich auch in den Schichten unterhalb des Endothels feststellen, v.a. in den glatten Gefäßmuskulzellen.
- Ein mutierter Decoy führte zu einer Expression des ET_A- und des ET_B-Rezeptors. Diese lag höher als in der consensus dODN-Gruppe. Die Wirksamkeit der Mutation kann somit weitgehend angenommen werden.

- Eine Expression von Endothelin und der begleitenden Hochregulation der Rezeptoren ist an hohe Blutdrücke mit entsprechender Schub- und Druckbelastung gekoppelt. In venösen Bypassgrafts, die einem arteriellen Druck ausgesetzt sind, lässt sich eine Expression nachweisen. Native Venen, die nur dem venösen Druck ausgesetzt sind, zeigen in der semi-quantitativen Bewertung lediglich eine Rezeptorausprägung in physiologischer Größenordnung (Grad 1).

4.3.9. Nachweis von Bypassokklusionen

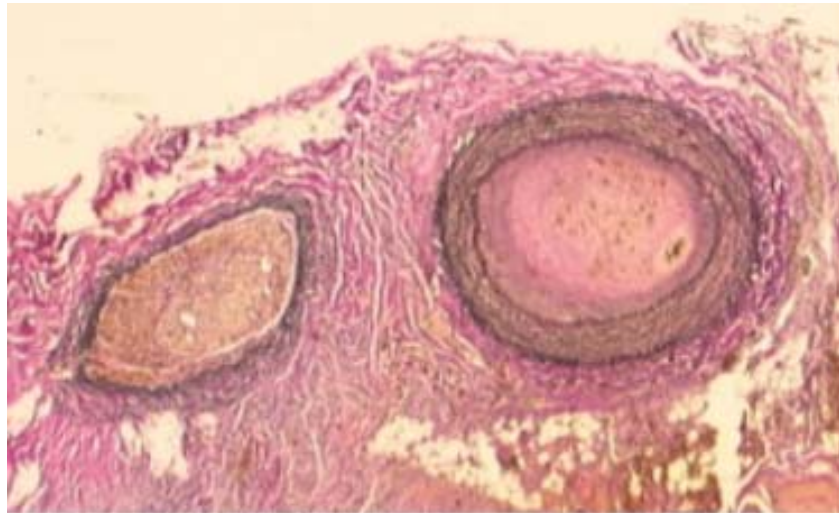


Abb. 26:

Beispiel einer thrombotischen Okklusion von Bypass und Arterie. Letztere bedingt durch die Ligatur des Gefäßes. Innerhalb des Thrombus der Vene sind Revaskularisationsgefäße zu erkennen (EvG, Vergrößerung x10).

5. Diskussion

Ziel dieser experimentellen Arbeit war es, im Tierversuch eine Intimahyperplasie in venösen Bypassgefäßen auf genetischer Ebene zu unterbinden. In Voruntersuchungen konnte das Aktivatorprotein-1 (AP-1) als Steuerelement der Transkription für das pre-pro-Endothelin-1 (ppET-1)-Gen mit nachfolgender Endothelinbildung als mögliches Target einer Therapie identifiziert werden (*Lauth M et al. 2000c*). Vom ACE-Hemmer Ramipril und dem verwendeten Transkriptionsfaktor decoy Oligodesoxynukleotid (dODN) ist bekannt, dass sie in der Lage sind, eine deformationsbedingte Genexpression in der Gefäßwand auf der Ebene der Transkription zu unterdrücken. In beiden Therapiearmen wurde die Wirkung des ACE-Hemmers *Quinapril* und der dODNs miteinander verglichen. Ferner war von Interesse, inwieweit eine Downregulation des Endothelins auch zu einer Abnahme der Rezeptordichte für den Endothelin A- und B-Rezeptor führt. Zur Beantwortung wurden histologische Spezialfärbungen unternommen und quantitativ ausgewertet.

5.1. Wirkung von Schubspannung auf das Gefäßendothel

Als Schubspannung (shear stress) bezeichnet man die direkt auf das Endothel einwirkende Kraft des Blutflusses mit einer Auslenkung der Endothelien in Strömungsrichtung (*Davies PF et al. 1997*). Hierdurch können vasoaktive Substanzen freigesetzt, und Eingriffe in den Zellmetabolismus und die Genexpression induziert werden (*Davies PF et al. 1995*). Der Blutfluss an sich zeigt bei laminarem Verlauf und physiologischem Druck eine atheroprotektive Wirkung auf mehreren Ebenen. Eine Schlüsselrolle nimmt hier die Freisetzung von Stickstoffmonoxid (NO) durch Induktion der endothelialen NO-Synthase (eNOS) ein (*Vanhoutte PM. 1989; Topper JN et al. 1996; Busse R et al. 1998*). Kommt es allerdings zu einer turbulenten Strömung mit ungleichen Kraftvektoren innerhalb des Gefäßes, entsteht eine Prädilektionsstelle für Plaqueanlagerungen durch mechanische Schädigung und die lokale Ausschüttung von proatherosklerotischen Faktoren (*Malek AM et al. 1995; Traub O et al. 1998*). Der bedeutendste ist hierbei der Vasokonstriktor Endothelin, der gleichzeitig auch ein Stimulus für eine vaskuläre Muskelproliferation und Migration in die Intima darstellt. Darüber hinaus konnten Cattaruzza et al. im Zusammenhang mit erhöhten ET-1 Werten nach supraphysiologischer Druckbelastung in FACS-Analysen eine erhöhte Caspase-3 Aktivierung und eine Chromatin-Kondensation in der glatten Gefäßmuskulatur nachweisen (*Cattaruzza M et al. 2000*). Neben einer Reihe von weiteren proapoptotischen

Faktoren (u.a. Radikalbildung, Wachstumsfaktoren, Cytokinen, etc. (*Rössig L et al. 2001*)) deutet dies auf eine nicht unwesentliche Beteiligung des ET bei der Apoptose innerhalb der Gefäßschichten im Rahmen der hypertensiven Vaskulopathie hin.

5.2. Wirkung von decoy Oligodesoxynucleotiden gegen das Aktivator-Protein-1 auf die Endothelin-1 Ausschüttung

In der vorliegenden Arbeit wurde versucht, die Bildung von Endothelin (ET) im venösen Bypass auf der Ebene der Transkription zu unterdrücken. In in vitro Voruntersuchungen konnten Lauth et al. (2000b) zeigen, dass es bei Anhebung des intravenösen Blutdrucks im Perfusionsmodell der Vena jugularis des Kaninchens von 1-5 auf 20 mmHg zu einer deutlichen Zunahme der pre-pro-Endothelin-1 (ppET-1) mRNA Expression und der intravaskulären ET-1 Ausschüttung kommt. In der Gefäßmuskulatur konnte ein Anstieg der ET_B-Rezeptor mRNA und des Rezeptors selbst nachgewiesen werden. Zu gleichem Ergebnis kamen in vitro Untersuchungen an der Arteria carotis des Kaninchens (*Lauth M et al. 2000a*). Somit scheint ein gleicher Mechanismus im Rahmen der Entstehung einer hypertensiven Läsion in beiden Gefäßtypen vorzuliegen. In einer weiteren Studie konnte Lauth belegen, dass sich mit einem decoy Oligodesoxynucleotid (dODN) gegen das Transkriptionsfaktor-Aktivatorprotein-1 (AP-1), die dehnungsinduzierte ppET-1 Expression in Arterien mit hypertensiven Drücken verhindern lässt. Eine Endothelinausschüttung unterblieb (*Lauth M et al. 2000c*). Im untersuchten Kaninchenmodell konnte der gleiche Mechanismus bei Venenbypässen mit hypertensiven Drücken aufgezeigt werden. Es kam im untersuchten Kollektiv zu einer signifikanten Reduktion der Intimahyperplasie im Vergleich zur Kontrollgruppe ($p=0,029$). Eine positive Wirkung des dODN in vivo kann somit angenommen werden. Gründe für die leichte Intimareduktion in der Gruppe mit mutiertem dODN lassen sich aus den Ergebnissen nicht ablesen. Hier könnte theoretisch eine Restaktivität des Decoys möglich sein.

5.3. Wirkung von Quinapril auf die Endothelin-1 Ausschüttung

Durch die Ergebnisse verschiedener Studien (HOPE - Heart Outcomes Prevention Evaluation, SECURE – Study to Evaluate Carotid Ultrasound changes in patients with Ramipril and vitamin E, APRES - ACE inhibition Post Revascularisation Study) konnte gezeigt werden,

dass sich die Prognose von Patienten mit atherosklerotisch bedingten Herzerkrankungen unter Therapie mit ACE-Hemmern deutlich bessert (*Schölkens BA et al. 2002*). Strittig ist nach wie vor die Frage, ob es einen Unterschied bezüglich der vasoprotektiven Wirkung innerhalb der verschiedenen Klassen von ACE-Hemmern gibt. Hintergrund ist die unterschiedliche Affinität der Substanzen zum Gewebe und die ungleiche Bildung von NO als vasodilatatorischer Mediator. Hornig et al. (1998) und Tsikouris et al. (2004) konnten hier eine Überlegenheit des Quinaprils gegenüber Enalapril feststellen. Die Gruppe um Lauth et al. (2001) beobachtete unter erhöhtem intraluminalen Druck in extrakorporal perfundierten Venensegmenten des Kaninchens, dass eine Vorbehandlung der Segmente mit Ramiprilat sowohl die druckinduzierte Steigerung der ppET-1 mRNA-Expression, als auch die ET-1 Ausschüttung verhindert. Nach Gabe von N^G-nitro-L-arginin (Blockade der endogenen NO-Produktion) oder Icatibant (Blockade des B₂-Rezeptors) konnte der beobachtete Effekt komplett verhindert werden. Es kann angenommen werden, dass endotheliales NO auf bisher ungeklärte Weise auch eine Rolle in der Transkriptionssteuerung des ppET-1 Gens und der Regulation des ET_B-Rezeptors spielt (*Lauth M et al. 2001*). Quinapril, als im Vergleich stärkster Stimulus für die eNOS-Produktion, schien somit ideal, um seine Wirkung auf die Transkription durch Beobachtung eines histologisch nachweisbaren Effekts zu untersuchen. Ausgehend von der unbehandelten Kontrollgruppe mit einem Mittelwert der Intimadicke von $66,4 \pm 18,5 \mu\text{m}$, wäre unter ACE-Hemmer Medikation eine Reduktion des Wertes durch o.g. Mechanismus zu erwarten gewesen. Im vorliegenden Versuch stieg allerdings die Intimadicke auf $101,8 \pm 35,2 \mu\text{m}$ an. Eine Unterdrückung der Wirkungen durch Icatibant oder L-NAME hätte erwartungsgemäß eine deutliche Zunahme der Intimadicken zur Folge gehabt. Im vorliegenden Fall trifft dies nur für die Gruppe unter Quinapril und Icatibant zu. Als verantwortlich könnte hier der Wegfall der B₂-Rezeptor typischen Wirkungen auf das Endothel sein. Die Gabe von Quinapril und L-NAME hat de facto keine Veränderung im Vergleich zur Kontrollgruppe ergeben. Als einschränkend für die Interpretation müssen in diesem Zusammenhang die großen Streuungen innerhalb der Gruppen ($18,5 - 98,3 \mu\text{m}$) angesehen werden. Da eine sichere Applikation der Medikamente bei gleicher operativer Technik und standardisierter Gewinnung und Aufbereitung der Proben garantiert werden kann, geben die Resultate Anlass zu weiteren Untersuchungen. Als eine Hypothese könnte eine unzureichende Wirkung von Quinapril im Gegensatz zum Ramipril beim Kaninchen diskutiert werden. Vergleichende Studien zur Resorption im Kaninchen in vivo Versuch liegen derzeit nicht vor. Ferner waren die oben zitierten Voruntersuchungen in vitro Versuche, so dass unbekannte Variablen im in vivo Tierversuch zum dargestellten Ergebnis

geführt haben könnten. Harrigan et al. (1989) stellten fest, dass beim Kaninchen eine bis zu 10fach höhere Dosierung des ACE-Hemmers Captopril notwendig war um eine dem Menschen vergleichbare Wirkung zu erzielen. Auf der anderen Seite waren lediglich 20% der vergleichbaren humanen Dosis notwendig um eine Intimahyperplasie zu verhindern. Inwieweit ähnliche Unterschiede beim Quinapril vorliegen, konnte im Rahmen dieser Arbeit nicht geklärt werden. Die Voruntersuchungen von Lauth et al. (2001) in denen eine Beeinflussung des ppET-1 Gens durch die Gabe von Ramiprilat gezeigt werden konnte, sollten weiterverfolgt werden und klären, wie NO einen direkten Einfluss auf die Genexpression nimmt. Interessant ist ferner die Frage, ob neben dem ppET-1 Gen auch weitere Gene durch NO induziert, supprimiert oder moduliert werden.

5.5. Expression des Endothelin-A und Endothelin-B Rezeptors

Beim Menschen und vielen Tieren wird die Wirkung des Endothelin-1 (ET-1) auf das Gefäß vornehmlich durch zwei G-Protein-gekoppelte Transmembran-Rezeptorproteine, den ET_A und den ET_B-Rezeptor (ET_A-R, ET_B-R), vermittelt. Intrazellulär kommt es hierbei zu einer Erhöhung des Calciums, das eine Signaltransduktion initiiert (*Takigawa M et al. 1995*). Beim Menschen findet sich der ET_A-R vornehmlich in der Tunica muscularis der Gefäße und führt zu einer Vasokonstriktion. Der ET_B-R kann in Abhängigkeit seines Expressionsortes zwei Funktionen übernehmen: In der Gefäßmuskulatur führt er zu einer Vasokonstriktion; wird er in den Endothelzellen des Gefäßes exprimiert, verursacht eine ET_B-R Aktivierung jedoch eine Vasodilatation (*Berger R et al. 2001*). Diese wird gesteuert über die Aktivierung der NO Synthase mit nachfolgender Freisetzung von Stickstoffmonoxid. Innerhalb dieses Mechanismus kann sich somit ein Gleichgewicht aus vasokonstriktiven und vasorelaxierenden Einflüssen einstellen (*Wedel-Wellner M et al. 2002; Sanmartin M et al. 2003*). Die Rezeptorverteilung in der Vena jugularis des Kaninchens stellt sich ebenfalls als kombiniertes ET_A- und ET_B-System dar (*Sumner MJ et al. 1992; Calo G et al. 1996*). Darüber hinaus kann eine Stimulation des ET_B-R in Arterien zu einer Apoptose führen (*Lauth M et al. 2000a*), während es in Venen zu einer Proliferation kommen kann (*Lauth M et al. 2001*). Voruntersuchungen aus der selben Gruppe um Lauth et al. an isoliert perfundierten Segmenten der Vena jugularis des Kaninchens zeigten ferner, dass eine Druckbelastung der Venen zu einer Steigerung der ppET-1 mRNA und der ET_B-R mRNA führt, ohne dass es zu einem gleichzeitigen Anstieg der ET_A-Rezeptor Dichte kommt (*Lauth M et al. 2001*). Dieser Versuchsaufbau beinhaltete eine 30-minütige Equilibrierungsphase bei 0 mmHg. Danach

wurde der Druck für 6 Stunden auf 20 mmHg erhöht. Diese immunhistologischen Ergebnisse konnten im Rahmen der vorliegenden Arbeit weitgehend bestätigt werden, wobei in zwei Tieren eine geringe Zunahme in der Expression des ET_A-R nachgewiesen werden konnte. Diese abweichenden Befunde könnten mit einer späteren Hochregulation des ET_A-R auf den Druckreiz erklärt werden, da in den o.g. in vitro Versuchen nur kurze Untersuchungszeiträume (Stunden) angesetzt wurden. Entsprechend der Ergebnisse der vorliegenden Studie muss von einer geringen Drucksensitivität des ET_A-R ausgegangen werden. Innerhalb der Gruppe mit consensus dODN-Behandlung kam es zu einer immunhistochemisch nachweisbaren Reduktion des ET_B-Rezeptors. Dieses Ergebnis ist vermutlich auf eine Erniedrigung der ET-1 Ausschüttung zurückzuführen, die eine reaktiv vermehrte Bildung von ET_B-Rezeptoren überflüssig macht. Als Konsequenz dieser Beobachtung kann geschlussfolgert werden, dass neben einer erniedrigten Vasokonstriktion (ET_B-R in Tunica muscularis) auch eine Verminderung der NO-Freisetzung (ET_B-R in Endothelzellen) resultiert.

5.5. Auswahl des Tiermodells und Einfluss einer Antikoagulation

In den Untersuchungsgruppen fand sich nach Explantation ein relativ hoher Anteil (ca. 50%) von thrombosierte Transplantaten. Es ist unklar, was die Bypassverschlüsse verursachte. Vor Wundverschluss wurde in jedem Fall der freie und kräftige Blutfluss durch den Bypass visuell und palpatorisch kontrolliert und ggf. die Anastomose revidiert (3 Fälle). Vorstellbar ist eine Aktivierung der Gerinnung durch freiliegendes Kollagen im Bereich der Ein- und Ausstichstellen oder eine Adhäsion von Thrombozyten direkt an das intravasal freiliegende Nahtmaterial. In diesem Falle hätte ein Plättchenthrombus den auslösenden Mechanismus dargestellt. End-zu-Seit Anastomosen weisen spezifische Strömungseigenschaften auf. Im Vergleich zu anderen Studien (*Davies MG et al. 1999; Hanyu M et al. 2001*) die eine *Interposition* der Vene als Ersatz für ein reseziertes Stück der Arteria carotis verwenden, hat die End-zu-Seit Anastomose die deutlich ungünstigeren Flusseigenschaften (siehe auch Abb. 1). Durch die Veränderung einer laminaren in eine turbulente Strömung und der Verschiebung des Kraftvektors entstehen im abknickenden Bereich direkt an der Anastomose Prädispositionsstellen für artherothrombotische Ablagerungen. Durch diesen Mechanismus wäre ein Bypassverschluss ebenfalls zu erklären. Durch das Abbinden der Arteria carotis in der Mitte zwischen beiden Anastomosen ist es denkbar, dass sich im Bereich der Blutstase ein Koagel bildet, dass entweder in proximale oder distale Richtung auf die entsprechende

Anastomose zuwächst und in diesem Bereich zu einem Verschluss von Ein- oder Ausflussöffnung des Bypass führt. Das Risiko einer Thrombozyten- oder Plasmaprotein-induzierten Aktivierung der Gerinnung hätte durch entsprechende Medikamente verringert werden können. Allerdings zeigte sich bei den Vorplanungen, dass alle in Frage kommenden gerinnungshemmenden Substanzen auch einen direkten Effekt auf das Endothel haben oder haben können, so dass vor allem in Verbindung mit der dODN-Behandlung eine Aussage deutlich eingeschränkt wird. Hirko et al. (1993) berichten über eine direkte Reduktion von Intimahyperplasie in venösen Bypässen im Hundemodell nach Gabe von Aspirin. Bei gesunden Menschen konnte nach Gabe von Aspirin eine Reduktion des Blutflusses in Extremitäten beobachtet werden, die durch eine lokale Vasokonstriktion erklärt wurde (*Quyyumi A. 1998*). Im Gegensatz dazu kann Aspirin aber bei Patienten mit Atherosklerose eine verbesserte vasodilatative Antwort im erkrankten Gefäßbereich bewirken. Hier wird als Ursache u.a. die Unterdrückung des cyclooxygenase-abhängigen Vasokonstriktors Prostaglandin diskutiert (*Quyyumi A. 1998*). Cumarine als weitere Möglichkeit einer Antikoagulation sind in der Lage, die Produktion von NO in Endothelzellen zu supprimieren (*Schoedon G et al. 1994*). Im vorliegenden Fall hätte somit nicht differenziert werden können, ob eine NO-Reduktion durch Wegfall der ET_B-R Antwort der Endothelien (Wirkung der dODNs) oder durch die Cumarinwirkung hervorgerufen wurde. Interessant, und an dieser Stelle nicht zu klären, ist die Frage, ob die Cumarine ihre Hemmwirkung der NO-Synthase auch über eine direkte Einflussnahme am ET_B-R induzieren. Neben anderen, konnte die Gruppe um Welt et al. (2001) zeigen, dass nach arterieller Intimaverletzung im Kaninchenmodell (Ballon- und Stentbehandlung) und Gabe von Heparin, eine Neointimabildung und Proliferation von glatten Gefäßmuskeln effektiv verhindert werden konnte. Daten zur Situation bei venösen Bypässen liegen zur Zeit nicht vor. Es ist allerdings davon auszugehen, dass sich auch proliferative Veränderungen einstellen bzw. unterdrückt werden können. Das verwendete Modell wurde aus folgenden Gründen ausgewählt:

- Das Kaninchen-Modell zur Untersuchung von vaskulären Veränderungen ist wissenschaftlich etabliert und wird von vielen Arbeitsgruppen verwendet. Allerdings wird in den meisten Fällen eine Graftinterposition anstelle eines klassischen Bypass beschrieben.
- Um den Bedingungen im Rahmen einer aorto-koronaren Bypassoperation beim Menschen, vor allem in Hinsicht auf die Flusseigenschaften und den damit einhergehenden Gefäßveränderungen zu entsprechen, musste eine, hämodynamisch

ungünstigere, End-zu-Seit Anastomose gewählt werden, welche sich technisch unkompliziert in diesem Tiermodell etablieren ließ.

- Aufgrund der individuellen Einflussfaktoren von Antikoagulantien auf das Endothel bei verschiedenen Spezies und fehlender eindeutiger Datenlage beim Kaninchen, musste auf eine dauerhafte Anwendung dieser Medikamente im Hinblick auf eine einflussfreie Beurteilung verzichtet werden.
- In vitro Voruntersuchungen zu dieser Versuchsreihe wurden bereits mit isolierten Zellen oder isoliert perfundierten Gefäßabschnitten der Kaninchenrasse „Weiße Neuseeländer“ durchgeführt.
- Der B₂-Rezeptorantagonist HOE 140 zeigt im Kaninchen eine sehr hohe Selektivität für den B₂-Rezeptor und beeinflusst den B₁-Rezeptor nicht.

Für weitere Untersuchungen zu dieser Fragestellung muss abgewogen werden, ob das Kaninchenmodell aufgrund der kleinen Dimensionen z.B. im Vergleich zum Hunde- oder Schweinemodell weitergeführt werden sollte. Es wäre ferner notwendig, die genaue Wirkung der Antikoagulantien mit und auch ohne Behandlung von dODNs im isolierten Perfusionsmodell ex vivo zu analysieren und somit festzustellen, inwieweit diese Substanzen eine Intimahyperplasie beeinflussen. Die Konstanz der Verschlussrate innerhalb der verschiedenen Gruppen zeigt, dass offensichtlich keine gruppenspezifischen Faktoren eine Rolle gespielt haben. Durch das standardisierte Vorgehen der Versuchsdurchführung können auch hier individuelle Einflussfaktoren weitgehend ausgeschlossen werden.

5.6. Methodenkritik

In Zusammenarbeit mit der Heidelberger Arbeitsgruppe (vormals Göttingen) und basierend auf den Forschungsergebnissen von Prof. Hecker, wurde ein Studiendesign zur Umsetzung der bisherigen Erkenntnisse in einem in vivo Modell entwickelt. Die überwiegende Mehrzahl der Publikationen berichten über in vitro bzw. ex vivo Modelle (s. Tab. 3) bei der Anwendung von decoyODNs. Dabei wurden verschiedene Ansätze unternommen um kompetitiv die Wirkung von verschiedenen Mediatoren (z.B. E2F, NFκB) zu unterdrücken. Weltweit gibt es nach unseren Erkenntnissen im Moment lediglich zwei Arbeiten, die mit der vorliegenden Studie vergleichbar wären (*Buchwald AB et al. 2002; Kume M et al. 2002*). In beiden Arbeiten wird über die Beeinflussung des AP-1 / ppET-1 Weges zur Unterdrückung einer Intimahyperplasie berichtet. Dabei handelt es sich jedoch zum einen über ein „balloon-

injury“-Modell mit Liposomen-gestützter Transfektion bzw. um einen in vitro Versuch. Somit ist auch hier die Vergleichbarkeit begrenzt.

Die vorliegende Studie stellt einen der ersten Ansätze zur in vivo Testung eines Therapieansatzes mit decoyODNs zur Unterdrückung einer Intimahyperplasie mit Überprüfung einer potentiellen klinischen Therapieoption dar. Entsprechend der Notwendigkeit zur Festlegung eines Studiendesigns zwischen den einzelnen beteiligten Kooperationspartnern (Arbeitsgruppen in Marburg, Heidelberg (Göttingen) und Leipzig), mussten in einzelnen Punkten Minimalanforderungen in Kauf genommen werden, zumal zusätzlich viele Probleme erst im Verlauf der in vivo Versuche auftraten, die bei dieser neuen Therapieform vorher nicht bekannt waren (speziesbedingte Unterschiede in der Medikamentenwirkung, Probleme der Medikamentenapplikation, Applikationsform der decoyODNs für die Transplantatgefäße, Ausschluss einer systemischen Wirkung der decoyODNs, etc).

Demzufolge wurde primär eine standardisierte punktuelle Messung der Intimaprolieration in den Gruppen durchgeführt. Die computer-gestützte Auswertung einer „Intimafläche“ war in den kooperierenden Arbeitsgruppen nicht durchgehend verfügbar, so dass auf die herkömmliche „punktuelle Messung“ zurückgegriffen wurde. Ebenso konnte die immunhistochemische Auswertung nur semiquantitativ erfolgen. Bei der Auswertung konzentrierten wir uns ausschliesslich auf die Intima und haben eine Korrelation von Media- zur Intimadiecke nicht betrachtet. Mit Rücksicht auf eine potentielle pharmakologische Interferenz, wurde von jeder Antikoagulation abgesehen. Damit musste von vornherein eine entsprechende Verschlussrate der Transplantate in Kauf genommen werden. Die nach Abschluss der Studie festgestellte Verschlussrate von ca. 50% in den verschiedenen Gruppen, wird jedoch relativiert durch den Umstand der chirurgischen end-zu-seit Technik (Brückentransplantat) und fehlender Antikoagulation. Berichte über eine reduzierte Intimahyperplasie, die aufgrund eines *interponierten* Gefässabschnittes in einem Tiermodell veröffentlicht wurden, können nicht zu einem direkten Vergleich herangezogen werden. In der vorliegenden Arbeit wurde versucht, durch direkte ex vivo Applikation von decoyODNs in das Gefässtransplantat und anschliessender Transplantation eine Wirkung dieser Therapie auf die sich ausbildende Intimahyperplasie nachzuweisen. Durch diesen Ansatz sollte eine Übertragbarkeit auf die chirurgische Technik einer kardiochirurgischen Bypassoperation ermöglicht und eine Praxisrelevanz überprüft werden. Ein „balloon-injury“-Modell (*Kume M et al. 2002*) sowie eine indirekte Applikation von decoyODNs in das Herz (*Kawauchi M et al. 2000*) können keine Ansätze für eine verbesserte chirurgische Therapie der koronaren

Herzerkrankung liefern. Im Einklang mit diesen Überlegungen erfolgte die Etablierung eines Carotis-Bypass Modells am Kaninchen. Bei einem durchschnittlichen Gefässdurchmesser von einem Millimeter, sowohl des arteriellen Empfängergefässes als auch, zumindest initial, des jugularen Transplantatgefässes, wurden hierbei übertragbare chirurgisch-technische Bedingungen geschaffen, die bei einer aorto-koronaren Bypassoperation angetroffen werden. An dieser Stelle muss nochmals betont werden, dass bewusst auf den Einsatz von Transportvehikeln (Virus, Liposomen) verzichtet wurde. Die bereits nachgewiesene Permeation der decoyODNs in die Gefässwand bei entsprechender Inkubation muss als entscheidender Vorteil dieses Therapieansatzes gewertet werden.

Im Zusammenhang mit diesem Tiermodell traten nun eine Reihe von Problemen auf, welche die Auswertung der gewonnenen Ergebnissen beeinträchtigen mussten. Für den direkten Vergleich der Gruppen wurde ein Gefässareal des Transplantats ausgewählt, das sich ca. 2-3mm hinter der zentralen Anastomose befand. In diesem Bereich befindet sich entsprechend der Literaturangaben (*Malek AM et al. 1995*) der Ort der grössten Belastungen (Druck, Turbulenzen) des Gefässes. Im Rahmen der histologischen Aufarbeitung traten Gefässzerreissungen durch Anschnitte des Nahtmaterials auf, die die Anzahl der auswertbaren Schnitte deutlich dezimierte. Entsprechend der langen Implantationszeiträume (28 Tage), war eine subtile Präparation der voroperierten Gefässabschnitte erforderlich, so dass eine thrombotische Verlegung des Gefässtransplantates durch Kompression oder Verziehung gerade während der Entnahme nicht auszuschliessen ist. Wie bereits ausgeführt, konnten Gefässabschnitte mit den Anzeichen einer Thrombose nicht zur Auswertung gelangen.

Insgesamt wurde zur Überprüfung der Wirkungsweise nach Applikation von decoyODNs und nachfolgender Unterdrückung des ppET-1 ein chirurgisch anspruchsvolles Carotis-Bypassmodell am Kaninchen etabliert, wobei sich diese Hypothese bei harten Rahmenbedingungen beweisen sollte. Vor dem Hintergrund der klinischen Fragestellung wurde von vornherein eine direkte Applikation (intra-operative Abgabe des decoyODN) der Vergleichsgruppen mit systemisch applizierten Wirkstoffen entgegen gesetzt. In der vorliegenden Arbeit konnte die Wirkung der unterschiedlichen Medikamentenkombinationen nicht einwandfrei nachgewiesen werden, jedoch wurde in keiner Gruppe ein Proband in der postoperativen Phase aufgrund von Umständen verloren, die auf eine Medikamentenunverträglichkeit oder Intoxikation zurückzuführen ist. Im Gegensatz dazu berichtet Davis MG et al. in einer Studie von bis zu 50% Mortalität in einer Untersuchungsgruppe, die er auf die hohe Dosierung des Ramiprils zurückführte. Nur unter diesen extremen Bedingungen (unter Verwendung eines Interpositionsgrafts) konnte eine

Reduktion der Intima um 34% nachgewiesen werden (*Davies MG et al. 1995*). Es erhebt sich somit die Frage der dosisabhängigen Wirkung der ACE-Hemmer hinsichtlich der Reduktion der Intimahyperplasie, bzw. die Frage nach spezieabhängigen Unterschieden in der Wirkung der ACE-Hemmer. Bis zum Abschluss der vorliegenden Arbeit finden sich jedoch in der internationalen Literatur keine exakten Daten über diesen Sachverhalt.

Es lässt sich somit zusammenfassend feststellen, dass sich auch unter den komplizierten Bedingungen dieses Tiermodells die Unterdrückung der Intimahyperplasie durch den Einsatz von lokal applizierten decoyODNs gegen die Bildung von ppET-1 nachweisen liess, wodurch zu weiteren tierexperimentellen Untersuchungen motiviert wird.

5.7. Die lokale gentherapeutische Behandlung zur Überwindung der „venösen Bypasskrankheit“ nach aorto-koronarem Bypass – Eine Option für die Zukunft ?

In Bezug auf die Durchlässigkeit venöser aorto-koronarer Bypässe wird der Langzeiterfolg durch eine hohe Rate an Bluthochdruck bedingten Verschlüssen aufgrund einer Intimahyperplasie limitiert. Bisher gab es keinen durchgreifenden Erfolg auf der Suche nach Medikamenten, die diese „venous aortocoronary graft disease“ unterdrücken. Die Gentherapie eröffnet einen alternativen Weg zu einer kausalen und potentiell langfristigen Prävention und Therapie. Diese betrifft nicht nur die kardiochirurgische Intervention, sondern auch die Behandlung der Intimahyperplasie nach Ballondilatation und Stenting (*Buchwald AB et al. 2002*). Trotz der zur Zeit noch weitgehend ungeklärten Interaktionen der verschiedenen Mechanismen, bietet die Gentherapie schon erste klinische Therapieansätze. In der prospektiv, randomisierten PREVENT-Studie wurde unter kontrollierten Bedingungen eine ex-vivo Gentherapie am Menschen durchgeführt (*Mann MJ et al. 1999*). Hierbei wurde das Outcome autologer Venentransplantate nach wiederholtem infrainguinalem Bypass und nach Transfektion von decoy Oligodesoxynucleotiden (dODN) zur Inaktivierung des Zell-Zyklus Transkriptionsfaktors E2F beobachtet. Es zeigte sich ein hämodynamisch stabiler Verlauf mit Mediahypertrophie als Anzeichen eines Kompensationsmechanismus und eine Unterdrückung von neointimaler Hyperplasie. Neben der Gruppe um Mann et al. wurde eine gentechnische Beeinflussung des E2F auch von einer Reihe anderer Gruppen durchgeführt (*Eichstaedt HC et al. 2000; Mann JM et al. 2000; Dzau VJ et al. 2001; Ehsan A et al. 2001; Shintani T et al. 2002*).

Bevor die unterschiedlichen Targets einer möglichen therapeutischen Nutzung weiter diskutiert werden, soll zunächst auf die verschiedenen Möglichkeiten einer Genapplikation eingegangen werden. Hier stehen sich eine Transfektion mittels Vektor und eine natürliche Aufnahme von DNA aus dem extrazellulären Umfeld gegenüber. Sehen einige Gruppen (*Mann MJ et al. 2000*) einen natürlichen „uptake“ als nicht besonders effektiv an, so konnte die Arbeitsgruppe um Wagner et al. (2000) nachweisen, dass eine decoy ODN Transfektion ohne Vektoren oder mechanische Unterstützung mittels Ultraschall (*Miura S et al. 2002*), durchaus in therapeutischer Masse effektiv ist. Gleiches konnte basierend auf den o.g. Erfahrungen auch anhand der Ergebnisse der hier durchgeführten Arbeit gezeigt werden. In einer weiteren Studie räumen Mann et al. (2000) allerdings ein, dass unter einem erhöhten Druck von 300mmHg in einem Transfektionsbehälter durchaus eine Übertragung ohne Vector möglich ist. In diesen Versuchen wurde eine Effizienz von 89% nachgewiesen, die sich auch in einer entsprechenden Reduktion der mRNA-Expression und einer histologisch gesicherten Reduktion der Zellreplikation ausdrückte. Eine andere Arbeitsgruppe (*Shintani T et al. 2002*) führte eine Transfektion eines NFκB decoy unter intra- und extraluminalem Druck von 200 mmHg durch. Eine Reduktion der Intima konnte in diesen Versuchen ebenfalls nachgewiesen werden. Allerdings kam es zu einer deutlich höheren Proliferation glatter Gefäßmuskelzellen und einer erhöhten Synthese von extrazellulärer Matrix im Vergleich zu einer Gruppe unter normalen Druckverhältnissen. Hier wurde die Hypothese aufgestellt, dass die mechanische Belastung der Venenwand während der Transfektion ebenfalls zu einer Schädigung beitragen kann, die sich in einer erhöhten Proliferation ähnlich dem unbehandelten venösen Bypass äußert.

Eine weit verbreitete Methode des Gentransfers in eine Säugerzelle ist der Transport mittels viralem Vektor. Hier haben sich vor allem Retroviren als Hilfsmittel erwiesen. Nachdem Anteile ihres Genoms, die für einen reibungslosen Ablauf der Virusvermehrung notwendig sind, mutiert und somit inaktiviert wurden, werden Teile des rekombinanten Genoms in das Virus Genom geklont. Dieses kann nun in die Zielzelle eingebracht werden und die gewünschte Funktion ausüben. Allerdings kann bisher nicht vorausgesagt werden, ob es nicht durch eine erneute Mutation wieder zu einer Umwandlung in den alten, pathologischen Phänotyp kommt. Die Auseinandersetzung des menschlichen Organismus mit dem viralen Vector verursacht eine immunologische Antwort, die einen weiteren limitierenden Faktor dieser Methode darstellt. Alle bisher durchgeführten Untersuchungen am Versuchstier mittels viralem Vector waren auf ein Intervall von einer Woche bis zu 6 Monaten begrenzt. Aussagen

über chronische Nebenwirkungen oder die Induktion von proopathologischen Faktoren im Allgemeinen sowie proonkogenen Faktoren im Speziellen fehlt in der momentanen Literatur aufgrund der Kürze der Untersuchungszeiträume. Es stellt sich auch die Frage, ob gezielt nach solchen Nebenwirkungen geforscht wurde, um das bei allen Untersuchungen positive Ergebnis einer Reduktion der Intimahyperplasie nicht in Misskredit zu bringen.

Um das Risiko einer Mutation bei viralem Vector zu umgehen, besteht ferner die Möglichkeit, die zu transfizierende DNA in Liposomen einzuhüllen, die dann von der Zielzelle aufgenommen werden (*Suzuki J et al. 1999, Iwata A et al. 2000*). Diese Methode scheint sicherer zu sein, da keine Vector-Gene zum Einsatz kommen. Allerdings geben Harada et al. (1999) die Effizienz der Transfektion mit nur 8,5% an. Andere Autoren sprechen von lediglich $2,6 \pm 0,9\%$ nach liposomaler Transfektion (*Iwata A et al. 2000*). In beiden Arbeiten scheint allerdings die Dauer des direkten Kontakts von Liposomen mit der Gefäßwand willkürlich gewählt, so dass nicht ausgeschlossen werden kann, dass eine längere Kontaktzeit auch die Effizienz erhöht. Sowohl im ex vivo- als auch im in vivo- Versuch kommt es durch Schnitt bzw. durch Abklemmung zu einer Minderversorgung des betreffenden Bypassgefäßes mit Blut und Sauerstoff, so dass die Zeit einer Transfektion generell und unabhängig vom Vektor, limitiert ist.

Unklarheit besteht außerdem auch noch über das richtige Target, welches zur Unterdrückung einer Intimahyperplasie zu beeinflussen ist. Grundlage der Hyperplasie ist die Zellteilung der Intimazellen. Um in diesen Prozess einzugreifen, wurde die Isoform 1 des Transkriptionsfaktor E2F als Angriffspunkt einer Gentherapie benannt. Durch Mutation kann die Hochregulation einer Reihe von Genen in der G1-Phase des Zellzyklus unterbunden werden, was im Ausbleiben einer Proteinbiosynthese und einer Mitosehemmung resultiert (*Morishita R et al. 1998; Mann MJ et al. 1999; Mann MJ et al. 2000; Dzau VJ et al. 2001; Ehsan A et al. 2001; Nakamura T et al. 2002*). Darüber hinaus konnte noch eine Reihe weiterer therapeutischer Ansätze gefunden werden, die alle ebenfalls zu einer Reduktion der Intimahyperplasie führten.

Ansatz /Art	Setting	Vector	Besonderheiten	Autor
Tissue inhibitors of Metalloproteinase – 3	venöser Bypass im Schweinemodell; 28d	Adenovirus	TIMP-3 induziert zusätzlich Apoptose	White S et al. 2002
NFκB decoy	V.saphena magna auf LAD im Hundemodell	kein Vector; 200mmHg; 20 min	Moduliert Zelladhäsionsmoleküle und Zellzyklus	Shintani T et al. 2002
VEGF-C Gen Transfer	Ballon denudierte Kaninchen Aorta	Adenovirus	keine Wirkung bei VEGF- A Gentransfer	Hiltunen MO et al. 2000
Prostacyclin Synthase Gen Transfer (Plasmid)	Ballon denudierte Ratten Aorta	Influenza hemagglutinin		Harada M et al. 1999
Expression eines Urokinase Rezeptor fixierten Protease Inhibitor	humane V. saphena in vitro und Hundemodell in vivo	Adenovirus		Quax PHA et al. 2001
eNOS Gentransfer	humane V. saphena in vitro	Adenovirus	Hohe NO-Werte unterdrücken eine Intimahyperplasie	Cable DG et al. 1999
Serin Elastase Inhibitor Elafin Gen-Transfer	V. jugularis Interponat im Kaninchen	HVJ Liposomen	Unterdrückung extrazell. Matrixproteinen	O'Blenes S, et al. 2000

Tab. 3: Ansätze einer gentherapeutischen Beeinflussung zur Unterdrückung einer Intimahyperplasie

Der in dieser Arbeit verwendete Ansatz beinhaltet die gentechnische Downregulation der Endothelin-Synthese mit konsekutiver Erniedrigung des Endothelin-B-Rezeptors. Es konnte im Vorfeld nachgewiesen werden, dass ein Dehnungsstress direkt die Hochregulation des Aktivator-Proteins-1, welches die pre-pro-Endothelin-1-Synthese initiiert, startet. Somit kann direkt in den auslösenden Mechanismus, hoher Blutdruck und shear stress, auf genetischer Ebene eingegriffen werden. Alle anderen Ansätze lassen diese Hochregulation zu, wirken aber auf anderer Ebene antiproliferativ in Bezug auf die Intima. Wesentliche Vorteile der in dieser Arbeit verwendeten Methode sind:

- Kein unselektiver Eingriff an mehreren Stellen in den Zellzyklus.
- Es wird eine Proteinbildung (Endothelin) reguliert. Mit seinem Fehlen kann ein entscheidender Stimulus für die Zellproliferation von Endothel- und Muskelzellen eliminiert werden.
- Anzeichen einer Apoptose lagen nicht vor (*Cattaruzza M et al. 2002*).

- Ein Eingriff in die Zellintegrität im Sinne einer Beeinflussung von Matrixproteinen findet nicht statt.
- Es werden keine Vektoren (v.a. Viren oder Liposomen) benötigt.
- Eine mechanische Unterstützung der Transfektion (hohe Drücke extra- und intraluminal, Ultraschall) sind nicht notwendig. Es findet keine Schädigung des Gefäßes statt.

Es scheint außer Frage zu stehen, dass der Gentherapie in der Zukunft eine Schlüsselrolle bei der Behandlung der „venous aortocoronary graft disease“ zukommt. In den letzten Jahrzehnten ist es bei einer Fülle von Arzneistoffen nicht gelungen, einen langfristig Erfolg versprechenden Ansatz zur medikamentösen Behandlung zu finden. Die Dringlichkeit zur Lösung dieses Problems ist bei der hohen Anzahl der täglich notwendigen koronarchirurgischen und gefäßchirurgischen Interventionen, groß. Auch im Rahmen der Angioplastie ist eine Intimahyperplasie nach Endothelschädigung ein bedeutendes Thema, welche das Indikationsspektrum auf das gesamte Gebiet der vaskulären Medizin erweitert. Die Vielfältigkeit von Ansätzen und Wegen zu Unterdrückung einer Intimahyperplasie, wie in Tab. 3 gezeigt, macht aber auch die verschiedenen Schwierigkeiten deutlich:

- Eine kausale Therapie der VAGD wird nicht möglich sein, solange eine Vene als arterieller Bypass Verwendung findet. Die Therapie ist immer palliativ.
- Einen gemeinsamen Ansatzpunkt für eine Gentherapie der VAGD gibt es zur Zeit noch nicht. Einzelstudien zeigen lediglich, dass diverse Möglichkeiten bestehen. Ein Vergleich verschiedener Verfahren ist noch nicht erfolgt.
- Die optimale Methode zum Einbringen von Fremdgenen in die Zielzelle ist noch nicht gefunden. Es scheint allerdings festzustehen, dass der Einsatz von viralen Vektoren, wie sie im Moment in vielen in vitro und in vivo Versuchen beim Tier Verwendung finden, bedingt durch bekannte immunologische und unkalkulierbare genetische Nebenwirkungen, beim Menschen nicht ohne weiteres möglich sein wird.
- Angaben über eine Langzeitwirkung der Gentherapie liegen gegenwärtig noch nicht vor. Alle bisherigen Studien haben Beobachtungszeiträume von wenigen Wochen bis Monaten bei einmaliger Applikation des Fremdgens. Auch von der PREVENT-Studie gibt es zum derzeitigen Zeitpunkt keine aktuellen Angaben über den Zustand der Gefäße in Bezug auf das angestrebte Ziel der Reduktion einer Intimahyperplasie und der langfristigen Verhinderung einer Bypassokklusion.

Als abschließende Beurteilung kann festgehalten werden, dass, trotz der momentan bestehenden Schwierigkeiten einer gentechnischen Therapieoption der VAGD, mit der in dieser Arbeit vorgestellten Methode eine große kurative Option für die Zukunft besteht. Bedingt durch die vielen Variablen und zum Teil unvorhersehbaren Risiken, die die komplexe Entwicklung und Anwendung der Gentherapie mit sich bringt, stehen in der kardiovaskulären Medizin alle Bemühungen nach wie vor am Anfang. Vor allem die Abschätzbarkeit von langfristigen Risiken durch genetische Alterationen am humanen Genom, wird in Zukunft eine der größten Herausforderungen für die Forschung darstellen und deren Kritikern das größte Anliegen sein.

6. Abkürzungen

Abb.	Abbildung	mg/kgKG	Milligramm pro Kilogramm Körpergewicht
ABC	Avidin-Biotinylierten-Enzym- Complex	ml	Milliliter
ACE	Angiotensin-Converting Enzyme	mm	Millimeter
AMI	Akuter Myokardinfarkt	mRNA	messanger Ribonucleinsäure
Ang II	Angiotensin II	mut.	mutiert
AP	Angina pectoris	NaCl	Natriumchlorid
AP-1	Aktivatorprotein-1	nNOS	neuronale NO-Synthase
ARDS	acute respiratory distress syndrome	NO	Stickstoffmonoxid
AS	Aminosäure	NOS	NO-Synthase
BK	Bradykinin	o.g.	oben genannt
B ₂ - Rezeptor	Bradykinin-Rezeptor- Subgruppe 2	PBS	Phosphat-gepufferte Saline
C	Celsius	PGI ₂	Prostazyklin 2
Ca ²⁺	Calcium	ppET-1	pre-pro-Endothelin-1
cm	Zentimeter	RAS	Renin-Angiotensin-System
d	Tag	RNA	Ribonucleinsäure
DAB	Diaminobenzidin	Tab.	Tabelle
DNA	Desoxynucleinsäure	TF	Transkriptionsfaktor
dODN	decoy Oligodesoxynucleotid	ZNS	Zentrales Nervensystem
EDRF	Endothelial derived relaxing factor	µl	Mikroliter
EKG	Elektrokardiogramm	®	registriertes Warenzeichen
eNOS	endotheliale NO-Synthase		
ET	Endothelin		
ET-1,2,3	Endothelin-1,2,3		
ET _A -R	Endothelin-Rezeptor A		
ET _B -R	Endothelin-Rezeptor B		
g	Gramm		
h	Stunde		
HE	Haematoxylin-Eosin		
HOE 140	Eigennamen für Icatibant		
IgG	Immunglobulin G		
iNOS	induzierbare NO-Synthase		
kD	Kilo Dalton		
kg	Kilogramm		
KHK	Koronare Herzkrankheit		
LDL	low-density-lipoprotein		
L-NAME	N ^ω -nitro-L-arginin-methylester- hydrochlorid		
L-NIO	N(5)-(1-iminoethyl)-L-ornithin		
L-NMMA	N ^G -monomethyl-L-arginin		
Lsg.	Lösung		

7. Literaturverzeichnis

1. Akbary AM, Wirth KJ, Schölkens BA. Efficacy and tolerability of Icatibant (HOE 140) in patients with moderately severe chronic bronchial asthma. *Immunopharmacology*. 1996;33:238-242.
2. Annane S, Sanquer V, Sebille A, et al. Compartmentalised inducible nitric-oxide synthase activity in septic shock. *Lancet*. 2000;355:1143-8.
3. Austin CE, Foreman JC, Scadding GK. Reduction by HOE 140, the B₂ kinin receptor antagonist, of antigen-induced nasal blockage. *Br J Pharmacol*. 1994;111:969-971.
4. Avanzini F, Ferrario G, Santoro L, et al. Risks and benefits of early treatment of acute myocardial infarction with an angiotensin-converting enzyme inhibitor in patients with a history of arterial hypertension: analysis of the GISSI-3 database. *Am Heart J*. 2002;144:1018-25.
5. Barbaé J, Marceau F, Theriault B, et al. Cardiovascular action of kinins in the rabbit. *Can J Physiol*. 1979;57:78-91.
6. Benefit of converting enzyme inhibition on left ventricular volumes and ejection fraction in patients receiving beta-blockade after myocardial infarction. CONSENSUS II multicenter study group. *Am Heart J*. 1996;132:71-7.
7. Berger R, Stanek B, Hülsmann M, et al. Effects of endothelin A receptor blockade on endothelial function in patients with chronic heart failure. *Circulation*. 2001;103:981-986.
8. Bielinska A, Schivdasani RA, Zhang L, et al. Regulation of gene expression with double-stranded phosphothioate oligonucleotides. *Science*. 1990;250:997-1000.
9. Blair A, Ahaul PW, Yuhanna IS, et al. Oxidized low density lipoprotein displaced endothelial nitric-oxide synthase (eNOS) from plasmalemmal caveolae and impairs eNOS activation. *J Biol Chem*. 1999;274:32512-19.
10. Bloch KD, Friedrich SP, Lee ME, et al. Structural organisation and chromosomal assignment of the gene encoding endothelin. *J Biol Chem*. 1989;264:10851-7.
11. Boegehold MA. Heterogeneity of endothelial function within the circulation. *Curr Opin Nephrol Hypertens*. 1998;7(1):71-8.
12. Böger RH, Bode-Böger SM. The clinical pharmacology of L-arginine. *Annu Rev Pharmacol Toxicol*. 2001;41:79-99.

13. Bonarjee VV, Carstensen S, Caidahl K, et al. Benefit of converting enzyme inhibition on left ventricular volumes and ejection fraction in patients receiving beta-blockade after myocardial infarction. CONSENSUS II multiecho study group. *Am Heart J*. 1996;132:71-7.
14. Boulanger C, Luscher TF. Release of endothelin from the porcine aorta. Inhibition by endothelium-derived nitric oxide. *J Clin Invest*. 1990;85:587-90.
15. Borghi C, Ambrosioni E, Magnani B. Effects of the early administration of zofenopril on onset and progression of congestive heart failure in patients with anterior wall acute myocardial infarction: The SMILE Study Investigators. *Survival of Myocardial Infarction Long-term Evaluation*. *Am J Cardiol*. 1996;78:317-22.
16. Botto N, Rizza A, Colombo MG, et al. Evidence for DNA Damage in Patients with Coronary Artery Disease. *Mutat Res*. 2001;27:493:23-30.
17. Brody SL, Crystal RG. Adenovirus mediated in vivo gene transfer. *Ann NY Acad Sci USA*. 1994;85:6460-4.
18. Buchwald AB, Wagner AH, Webel C, Hecker M. Decoy Oligodesoxynucleotide Against Activator Protein-1 Reduces Neointimal Proliferation After Coronary Angioplasty in Hypercholesterolemic Minipigs. *J Am Coll Cardiol*. 2002;39:732-8.
19. Busse R, Fleming I. Pulsatile stretch and shear stress: physical stimuli determining the production of endothelium-derived relaxing factors. *J Vasc Res*. 1998;35:73-84.
20. Cable DG, Caccitolo JA, Caplice N, et al. The role of gene therapy for intimal hyperplasia of bypass grafts. *Circulation*. 1999;100(suppl II):II-392-6.
21. Calo G, Gratton JP, Telemaque S, et al. Pharmacology of endothelins: vascular preparations for studying ETA and ETB receptors. *Mol Cell Biochem*. 1996;154(1):31-7.
22. Cameron AA, Davis KB, Rogers WJ. Recurrence of angina after coronary artery bypass surgery: predictors and prognosis (CASS Registry). *J Am Coll Cardiol*. 1995;4:895-899.
23. Campeau L, Enjalbert M, Lesperance J et al. The relation of risks to the developement of atherosclerosis in saphenous vein bypass grafts and the progerssion of disease in the native circulation: a study 10 years after coronary bypass surgery. *N Engl J Med*. 1984;311:1329-1332.
24. Cattaruzza M, Berger MM, Ochs M, et al. Deformation induced endothelin B receptor-mediated smooth muscle cell apoptosis is matrix-dependent. *Cell Death Differ*. 2002;9(2):219-26.

25. Cattaruzza M, Dimigen C, Ehrenreich H, et al. Stretch-induced endothelin B receptor-mediated apoptosis in vascular smooth muscle cells. *FASEB J*. 2000;14:991-998.
26. Cattaruzza M, Eberhardt I, Hecker M. Mechanosensitive Transcription Factors Involved in Endothelin-B Receptor Expression. *J Biol Chem*. 2001;276(40):36999-7003.
27. Chilton RJ. Recent Discoveries in Assessment of Coronary Heart Disease: Impact of Vascular Mechanisms on Development of Atherosclerosis. *J Am Osteopath Assoc*. 2001;101(9 Suppl): S1-5.
28. Cleland JG, Erhard L, Hall AS, et al. Validation of primary and secondary outcomes and classification of mode of death among patients with clinical evidence of heart failure after a myocardial infarction: a report from the Acute Infarction Ramipril Efficacy (AIRE) Study Investigators. *J Cardiovasc Pharmacol*. 1993;22 Supp 9:22-7.
29. Colman A. Antisense strategies in cell and developmental biology. *J Cell Sci*. 1990;97:399-409.
30. Cox JL, Chiasson DA, Gotlieb AI. Stranger in a strange land: the pathogenesis of saphenous vein graft stenosis with emphasis on structural and functional differences between veins and arteries. *Prog Cardiovasc Dis*. 1991;34:45-68.
31. D'Uscio LV, Shaw S, Barton M, et al. Lorsatan but not verapamil inhibits angiotensin-II-induced tissue endothelial-1 increase: role of blood pressure and endothelial function. *Hypertension*. 1998;31:1305-10.
32. Dagassan PH, Breu V, Clozel M, et al. Up-regulation of endothelin-B-receptors in atherosclerotic human coronary arteries. *J Cardiovasc Pharmacol*. 1996;27:147-53.
33. Davies MG, Fulton GJ, Svendsen E, et al. Time course of the regression of intimal hyperplasia in experimental vein grafts. *Cardiovasc Pathol*. 1999;8(3):161-8.
34. Davies MG, Klayachkin ML, Barber L, et al. Ramipril and experimental vein graft intimal hyperplasia. *Angiology*. 1995;46(2):91-7.
35. Davies PF. Flow-mediated endothelial mechanotransduction. *Physiol Rev*. 1995;75:519-560.
36. Davies PF, Barbee KA, Volin MV, et al. Spatial relationships in early signaling events of flow-mediated endothelial mechanotransduction. *Annu Rev Physiol*. 1997;59:527-49.

37. Dzau VJ, Mann MJ, Ehsan A, et al. Gene therapy and genomic strategies for cardiovascular surgery: the emerging field of surginomics. *J Thorac Cardiovasc Surg.* 2001;121:206-16.
38. Dray A, Perkins M. Bradykinin and inflammatory pain. *Trends Neurosci.* 1993;16:99-104.
39. Ehsan A, Mann MJ, Dell'Acqua G, et al. Long-term stabilization of vein graft wall architecture and prolonged resistance to experimental atherosclerosis after E2F decoy oligodesoxynucleotide gene therapy. *J Thorac Cardiovasc Surg.* 2001;121:714-22.
40. Eichstädt HC, Liu TJ, Nolden LK, et al. Gene transfer of the transcription factor E2F to bypass vein grafts in a hypercholesterolemic rabbit model. Vortrag – 14th Annual Meeting of the EACTS. Frankfurt, Deutschland; 07.- 11. Oktober 2000.
41. Favalloro RG. Saphenous vein autograft replacement of severe segmental coronary artery occlusion: operative technique. *Ann Thorac Sur.* 1968;5(4):334-9.
42. Feletou M, Martin CAE, Molimard M, et al. In vitro effects of HOE 140 in human bronchial and vascular tissue. *Eur J Pharmacol.* 1995;274:57-64.
43. Fitzgibbon GM, et al. Coronary Bypass Graft Fate and Patient Outcome : Angiographic Follow-Up of 5,065 Grafts Related to Survival and Reoperation in 1,388 Patients During 25 Years. *J Am Coll Cardiol.* 1996;28:616-26.
44. Forstermann U. Biochemistry and molecular biology of nitric oxide synthases. *Arzneimittelforschung.* 1994;44:402-7.
45. Fuchgott RF, Zawadzki JV. The obligatory role of endothelial cells in the relaxation of arterial smooth muscle by acetylcholine. *Nature.* 1980;288:373-374.
46. Garrett HE, Dennis EW, DeBakey ME. Aortocoronary bypass with saphenous vein graft: seven-year follow up. *JAMA.* 1973;223:792-794.
47. Gielen S, Schuler G and Hambrecht R. Exercise Training in Coronary Artery Disease and Coronary Vasomotion. *Circulation.* 2001;103:e1-e6.
48. Gobeil F, Filteau C, Pheng LH, et al. In vitro and in vivo characterization of bradykinin B₂ receptors in the rabbit and the guinea pig. *Can J Physiol Pharmacol.* 1996;74:137-144.
49. Goodman L, Gilman AG. *Pharmakologische Grundlagen der Arzneimitteltherapie*, 9. Auflage. London, McGraw Hill, 609-32, 1999.
50. Gross SS, Wolin MS. Nitric oxide: pathophysiological mechanisms. *Annu Rev Physiol.* 1995;57:737-69.

51. Hanyu M, Kume N, Ikeda T, et al. VCAM-1 expression precedes macrophage infiltration into subendothelium of vein grafts interposed into carotid arteries in hypercholesterolemic rabbits- a potential role in vein graft atherosclerosis. *Atherosclerosis*. 2001;158(2):313-9.
52. Harada M, Toki Y, Numaguchi Y, et al. Prostacyclin synthase gene transfer inhibits neointimal formation in rat balloon-injured arteries without bleeding complications. *Cardiovasc Res*. 1999;43:481-491.
53. Harrigan JR, Meredith PA, Reid JL. Interspecies differences in in vitro ACE inhibition (abstract). *Proceedings of the Fourth European Meeting on Hypertension*, 1989.
54. Hawkins RD, Son H, Aranico O. Nitric oxide as a retrograde messenger during long term potentiation in hippocampus. *Prog Brain Res*. 1998;118:155-72.
55. Heeringa P, Steenbergen E, van Goor H. A protective role for endothelial nitric synthase (eNOS) in glomerulonephritis. *Kidney Int*. 2002;61:822-825.
56. Hernandez-Pando R, Schon T, Orozco EH, et al. Expression of inducible nitric oxide synthase and nitrotyrosine during the evolution of experimental pulmonary tuberculosis. *Exp Toxicol Pathol*. 2001;53:257-265.
57. Hess JF, Borkowski JA, Stonesifer GY, et al. Differential pharmacology of cloned human and mouse B2 bradykinin receptors. *Mol Pharmacol*. 1994;45:1-8.
58. Hiltunen MO, Laitinen M, Turunen P, et al. Intravascular adenovirus-mediated VEGF-C Gene Transfer reduces neointimal formation in balloon-denuded rabbit aorta. *Circulation*. 2000;102:2262-2268.
59. Hirko MK, McShannic JR, Schmidt SP, et al. Pharmacologic modulation of intimal hyperplasia in canine vein interposition grafts. *J Vasc Surg*. 1993;17:877-87.
60. Hock FJ, Wirth K, Albus U, et al. HOE 140 a new potent and long acting bradykinin antagonist: in vivo studies. *Br J Pharmacol*. 1991;102:769-773.
61. Hornig B, Arakawa N, Drexler H, et al. Differential effects of quinapril and enalaprilat on the endothelial function of conduit arteries in patients with chronic heart failure. *Circulation*. 1998;103:799-805.
62. Hosoda K, Nakao K, Hiroshi A, et al. Cloning and expression of human endothelin-1 receptor cDNA. *FEBS Lett*. 1991;287:23-6.
63. Ignarro LJ, Buga GM, Wood KS, et al. Endothelium-derived relaxing factor produced and released from artery and vein in nitric oxide. *Proc Natl Acad Sci USA*. 1987;84:9265-9.

64. Ihling C, Gobel HR, Lippoldt A, et al. Endothelin-1-like immunoreactivity in human atherosclerotic coronary tissue: a detailed analysis of the cellular distribution of endothelin-1. *J Pathol.* 1996;179:303-8.
65. Inoue A, Yanagisawa M, Kimura S, et al. The human endothelin family: three structurally and pharmacologically distinct isopeptides predicted by three separate genes. *Proc Natl Acad Sci USA.* 1989;86:2863-7.
66. Ishikawa T, Yanagisawa M, Kimura S, et al. Positive chronotropic effect of endothelin, a novel endothelium-derived vasoconstrictor peptide. *Pflugers Arch.* 1998;413:108-10.
67. ISIS-4: a randomised factorial trial assessing early oral captopril, oral mononitrate, and intravenous magnesium sulphate in 58,050 patients with suspected acute myocardial infarction. ISIS-4 collaborative group. *Lancet.* 1995;345:669-85.
68. Ito H, Hirata Y, Adachi S, et al. Endothelin-1 is an autocrine/paracrine factor in the mechanism of angiotensin II-induced hypertrophy in cultured rat cardiomyocytes. *J Clin Invest.* 1993;92:398-403.
69. Iwata A, Sai S, Moore M, et al. Gene therapy of transplant arteriopathy by liposome-mediated transfection of endothelial nitric oxide synthase. *J Heart Lung Transplant.* 2000;19:1017-1028.
70. Johnston CI, Burrell LM, Perich R, et al. The tissue renin-angiotensin system and its functional role. *Clin Exp Pharmacol Physiol.* 1992;19:1-5.
71. Johnson G, Carlson P, Francis GS, et al. Influence of prerandomisation (baseline) variables on mortality and on the reduction of mortality by enalapril. Veterans Affairs Cooperative Study on vasodilator therapy of heart failure (V-HeFT II). V-HeFT VA Cooperative Studies Group. *Circulation.* 1993;87:VI32-9.
72. Kawauchi M, Suzuki J, Morishita R, et al. Gene therapy for attenuating cardiac allograft arteriopathy using ex vivo E2F decoy transfection by HVJ-AVE-liposome method in mice and nonhuman primates. *Circ Res.* 2000;87:1063-1068.
73. Keilani T, Schlueter W, Butte D, et al. Selected aspects of ACE inhibitor therapy for patients with renal disease: impact on proteinuria, lipids and potassium. *J Clin Pharmacol.* 1995;35:87-97.
74. Kjekshus J, Swedberg K, Snapinn S. Effects of enalapril on long-term mortality in severe congestive heart failure. CONSENSUS Trial Group. *Am J Cardiol.* 1992;69:103-7.

75. Kober L, Torp-Petersen C, Carlsen JE, et al. A clinical trial of the angiotensin-converting-enzyme inhibitor trandolapril in patients with left ventricular dysfunction after myocardial infarction. Trandolapril Cardiac Evaluation (TRACE) Study Group. *N Engl J Med*. 1995;333:1670-76.
76. Koch K. Eine Todesursache ändert ihren Charakter. *Dtsch Arztebl*. 2000;97:A583-4.
77. Koenig W, Hoffmeister A, Khuseyinova N, et al. Atherosklerose als inflammatorischer Prozess. *Dtsch Arztebl*. 2003;100:A 117-126.
78. Kubes P, Suzuki M, Granger DN. Nitric oxide: an endogenous modulator of leukocyte adhesion. *Proc Natl Acad Sci USA*. 1991;88:4651-4655.
79. Kume M, Komori K, Matsumoto T, et al. Administration of a decoy against the activator protein-1 binding site suppresses neointimal thickening in rabbit balloon-injured arteries. *Circulation*. 2002;105:1226-1232.
80. La M, Reid JJ. Endothelin-1 and the regulation of vascular tone. *Clin Exp Pharma Phys*. 1995;22:315-323.
81. Lauth M, Cattaruzza M, Hecker M. ACE Inhibitor and AT1 Antagonist Blockade of Deformation-Induced Gene Expression in the Rabbit Jugular Vein Through B2 receptor Activation. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. 2001;21(1):61-6.
82. Lauth M, Berger MM, Cattaruzza M, Hecker M. Elevated perfusion upregulates endothelin-1 and endothelin B receptor expression in the rabbit carotid artery. *Hypertension*. 2000a;35(2):648-54.
83. Lauth M, Berger MM, Cattaruzza M, Hecker M. Pressure-induced upregulation of preproendothelin-1 and endothelin B receptor expression in the rabbit jugular vein in situ: implication for vein graft failure? *Arterioscler Throm Vasc Biol*. 2000b;20(1):96-103.
84. Lauth M, Wagner AH, Cattaruzza M, et al. Transcriptional control of deformation-induced preproendothelin-1 gene expression in endothelial cells. *J Mol Med*. 2000c;78:441-450.
85. Lee PC, Salyapongse AN, Bragdon GA, et al. Impaired wound healing and angiogenesis in eNOS-deficient mice. *Am J Physiol*. 1999;277:H1600-08.
86. Lerman A, Holmes DR, Bell MR, et al. Endothelin in coronary endothelial dysfunction and early atherosclerosis in humans. *Circulation*. 1995;92:2426-31.
87. Lüscher T, Brton M. Endothelins and endothelin receptor antagonists- therapeutic considerations for a novel class of cardiovascular drugs. *Circulation*. 2000;102:2434-2440.

88. Maggi CA. Bradykinin as an inflammatory mediator in the urinary tract. In: Farmer SG. (Ed.), *The Kinin System*. Academic press, San Diego, 1997:235-247.
89. Malek AM, Izumo S. Control of endothelial cell gene expression by flow. *J Biochem*. 1995;28(12):1515-28.
90. Mancini GB, Henry GC, Macaya C, et al. Angiotensin-converting enzyme inhibition with quinapril improves endothelial vasomotor dysfunction in patients with coronary artery disease. The TREND Study. *Circulation*. 1996;94(3):258-65.
91. Mann MJ. Gene therapy for vein grafts. *Curr Cardiol Rep*. 2000;2(1):29-33.
92. Mann MJ, Dzau VJ. Therapeutic applications of transcription factor decoy oligodeoxynucleotides. *J Clin Invest*. 2000;106(9):1071-1075.
93. Mann MJ, Whittemore AD, Donaldson MC, et al. Ex-vivo gene therapy of human vascular bypass grafts with E2F decoy: the PREVENT single-centre, randomised, controlled trial. *Lancet*. 1999;354:1493-98.
94. Marceau F, Levesque L, Drapeau G, et al. Effects of peptide and non peptide antagonists of bradykinin B₂ receptors on the venoconstrictor action of bradykinin. *J Pharmacol Exp Ther*. 1994;269:1136-1143.
95. Menke JG, Borkowski JA, Bierilo KK. Expression cloning of a human B1 bradykinin receptor. *J Biol Chem*. 1994;269:21583-6.
96. Michel T, Li GK, Busconi L. Phosphorylation and subcellular translocation of endothelial nitric oxide synthase. *Proc Natl Acad Sci USA*. 1993;90:6252-6.
97. Minamino T, Kurihara H, Takahashi M, et al. Endothelin-converting enzyme expression in the rat vascular injury model and human coronary atherosclerosis. *Circulation*. 1997;95:221-30.
98. Miura S, Tachibana K, Okamoto T, et al. In vitro transfer of antisense oligodeoxynucleotides into coronary endothelial cells by ultrasound. *Biochem Biophys Res Commun*. 2002;298:587-590.
99. Morishita R, Higaki J, Tomita N, et al. Application of transcription factor „decoy“ strategy as means of gene therapy and study of gene expression in cardiovascular disease. *Circ Res*. 1998;82:1023-1028.
100. Moye LA, Pfeffer MA, Braunwald E. Rationale, design and baseline characteristics of the survival and ventricular enlargement trial. SAVE investigators. *Am J Cardiol*. 1991;68:70D-79D.

101. Nakamura T, Morishita R, Asai T, et al. Molecular strategy using cis-element „decoy“ of E2F binding site inhibits neointimal formation in porcine balloon-injured coronary artery model. *Gene Therapy*. 2002; 9(8):488-494.
102. Newman KD, Dunn PF, Owens JW, et al. Adenovirus mediated gene transfer into normal rabbit arteries results in prolonged vascular cell activation, inflammation, and neointimal hyperplasia. *J Clin Invest*. 1995;96:2955-65.
103. Niranjana V, Telemaque S, deWit D, et al. Systemic hypertension induced by hepatic overexpression of human pre-proendothelin-1 in rats. *J Clin Invest*. 1996;98:2364-72.
104. Nishida K, Harrison DG, Navas JP, et al. Molecular cloning and characterization of the constitutive bovine aortic endothelial cell nitric oxide synthase. *J Clin Invest*. 1992;90:2092-2096.
105. O'Blenes SB, Zaidi SH, Cheah AY, et al. Gene transfer of the serine elastase inhibitor elafin protects against vein graft degeneration. *Circulation*. 2000;102 (suppl III):III-289-95.
106. Ogawa Y, Nakao K, Arai H, et al. Molecular cloning of a non-isopeptide-selective human endothelin receptor. *Biochem Biophys Res Commun*. 1991;178(1):248-55.
107. Palmer RM, Moncada S. Vascular endothelial cells synthesize nitric oxide from L-arginine. *Nature*. 1988;333:664-666.
108. Pfeiffer S, Leopold E, Schmidt K, et al. Inhibition of nitric oxide synthesis by N^G-nitro-L-arginine methyl ester (L-NAME): requirement for bioactivation to the free acid, N^G-nitro-L-arginine. *Br J Pharmacol*. 1996;118:1433-1440.
109. Pohl U, Holtz J, Busse R, et al. Crucial role of endothelium in the vasodilator response to increase flow in vivo. *Hypertension*. 1986;8:37-44.
110. Pönicke K, Vogelsang M, Heinroth M, et al. Endothelin receptors in a failing and non-failing human heart. *Circulation*. 1998;97:744-51.
111. Porter KE, Olojugba DH, Masood I, et al. Endothelin-B Receptors Mediate Intimal Hyperplasia in an Organ Culture of Human Saphenous Vein. *J Vasc Surg*. 1998;28:695-701.
112. Quax PH, Lamfers ML, Lardenoye JW, et al. Adenoviral expression of a urokinase receptor-targeted protease inhibitor inhibits neointima formation in murine and human blood vessels. *Circulation*. 2000;103:562-569.
113. Quyyumi AA. Effects of Aspirin on endothelial dysfunction in Atherosclerosis. *Am J Cardiol*. 1998;82(10A):31S-33S.

114. Radomski MW, Palmer RM, Moncada S. An L-arginine/nitric oxide pathway present in human platelets regulates aggregation. *Proc Natl Acad Sci USA*. 1990;87:5193-7.
115. Radomski MW, Palmer RM, Moncada S. Endogenous nitric oxide inhibits human platelet adhesion to vascular endothelium. *Lancet*. 1987;8567:1057-1058.
116. Reaves PY, Beck CR, Wang HW, et al. Endothelial-independent prevention of high blood pressure in L-NAME-treated rats by angiotensin II type I receptor antisense gene therapy. *Exp Physiol*. 2003;88:467-73.
117. Regoli D, Barbare J. Pharmacology of bradykinin and related kinins. *Pharmacol Rev*. 1980; 32:1-46.
118. Regoli D, Jukic D, Gobeil F, et al. Receptors for bradykinin and related kinins: a critical analysis. *Can J Physiol Pharmacol*. 1993;71:556-67.
119. Rhaleb NE, Rouissi N, Jukic RJ, et al. Pharmacological characterisation of a new potent B₂-Rezeptor-Antagonist (Hoe 140). *Eur J Pharmacol*. 1992;163:263-272.
120. Rodriguez E, Lambert EH, Magno MG, et al. Contractile Smooth Muscle Cell Apoptosis Early After Saphenous Vein Grafting. *Ann Thorac Surg*. 2000;70:1145-53.
121. Rogers WJ, Johnston, DE, Yusuf S, et al. Quality of life among 5,025 patients with left ventricular dysfunction randomized between placebo and enalapril: the studies of left ventricular dysfunction. The SOLVD investigators. *J Am Coll Cardiol*. 1994;23:393-400.
122. Rossaint R, Falke KJ, Lopez F, et al. Inhaled nitric oxide for the adult respiratory distress syndrome. *N Engl J Med*. 1993;328:399-405.
123. Rössig L, Dimmeler S, Zeiher AM. Apoptosis in the vascular wall and atherosclerosis. *Basic Res Cardiol*. 2001;96:11-22.
124. Sabik III JF, Lytle BW, Blackstone EH, et al. Comparison of Saphenous Vein and Internal Thoracic Artery Graft Patency by Coronary System. *Ann Thorac Surg*. 2005;79:544-51.
125. Sanmartin M, Fernandez-Ortiz A, Fantidis P, et al. Effects of bosentan on neointimal response following coronary angioplasty. *Eur J Clin Invest*. 2003;33:762-768.
126. Schödon B, Blau N, Schneemann M, et al. Nitric oxide production depends on preceding tetrahydrobiopterin synthesis by endothelial cells: selective suppression of induced nitric oxide production by sepiapterin reductase inhibitors. *Biochem Biophys Res Commun*. 1994;199(2):504-10.

127. Schölkens BA, Landgraf W. ACE inhibition and atherogenesis. *Can J Physiol Pharmacol.* 2002;80(4):354-9.
128. Scott-Burden T, Schini VB, Elizondo E, et al. Platelet-derived growth factor suppresses and fibroblast growth factor enhances cytokine-induced production of nitric oxide by cultured smooth muscle cells. Effects on cell proliferation. *Circ Res.* 1992;71(5):1088-100.
129. Shichiri M, Kato H, Marumo F, et al. Endothelin-1 as an autocrine/paracrine apoptosis survival factor for endothelial cells. *Hypertension.* 1997;30:1198-203.
130. Shintani T, Sawa Y, Takahashi T, et al. Intraoperative transfection of vein grafts with the NF κ B decoy in a canine aortocoronary bypass model: A strategy to attenuate intimal hyperplasia. *Ann Thorac Surg.* 2002;74:1132-8.
131. Sitniewska EM, Wisniewska RJ. Influence of secretin and L-NAME on vascular permeability in the coronary circulation of intact and diabetic rats. *Regul Pept.* 2001;96:105-11.
132. Statistisches Bundesamt (Januar 2002). Gesundheitsberichterstattung des Bundes, Herz- und Kreislauf-Erkrankungen. [Online]. URL: <http://www.gbe-bund.de>
133. Sumner MJ, Cannon TR, Mundin JW, et al. Endothelin ETA and ETB receptors mediate vascular smooth muscle contraction. *Br J Pharmacol.* 1992 ;107(3) :858-60.
134. Suzuki J, Isobe M, Morishita R, et al. E2F Decoy suppresses E-selectin expression in murine cardiac allograft arteriopathy. *Transplantation Proceedings.* 2000;31:2018-19.
135. Takigawa M, Sakurai T, Kasuya Y, et al. Molecular identification of guanine-nucleotide-binding regulatory proteins which couple to endothelin receptors. *Eur J Biochem.* 1995;228(1):102-8.
136. Topper JN, Cai J, Falb D, et al. Identification of vascular endothelial genes differentially responsive to fluid mechanical stimuli: cyclooxygenase-2, manganese superoxide dismutase, and endothelial cell nitric oxide synthase are selectively up-regulated by steady laminar shear stress. *Proc Natl Acad Sci USA.* 1996;93:10417-10422.
137. Traub O, Berk BC. Laminar Shear Stress – Mechanisms by Which Endothelial Cells Transduce an Atheroprotective Force. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 1998;18:677-685.
138. Troitzsch D, Vogt S, Peukert A. Study of long-term anesthesia in rabbits. *Tierarzt Prax.* 1996;24(5):519-21.

139. Tsikouris JP, Simoni J, Suarez JA, et al. Comparison of effects of quinapril versus enalapril on vasoactive substances following acute myocardial infarction. *Am J Cardiol.* 2004;94(5):641-3, A9.
140. Tuzcu EM, Kapadia SR, Tutar E, et al. High Prevalence of Coronary Atherosclerosis in Asymptomatic Teenagers and Young Adults – Evidence From Intravascular Ultrasound. *Circulation.* 2001;103:2705-2710.
141. Vanhoutte PM. Endothelium and control of vascular function: state of the art lecture. *Hypertension.* 1989;13:658-667.
142. Vavrek RJ, Stewart JM. Competitive antagonists of bradykinin. *Peptides.* 1985;6:161-64.
143. Venema RC, Ju H, Zou R, et al. Subunit interactions of endothelial nitric-oxide synthase. Comparisons to the neuronal and inducible nitric-oxide synthase isoforms. *J Biol Chem.* 1997;272:1276-1282.
144. Verma S, Badiwala MV, Weisel RD, et al. C-reactive protein activates the nuclear factor κ B signal transduction pathway in saphenous vein endothelial cells: Implications for atherosclerosis and restenosis. *J Thorac Cardiovasc Surg.* 2003;126:1886-91.
145. Verrier ED, Boyle EM. Endothelial cell injury in cardiovascular surgery. *Ann Thorac Surg.* 1996;62:915-922.
146. Virchow R. 1860. Cellular pathology as based upon physiological and pathological history. Publ. Churchill, London, England.
147. Wagner AH, Krzesz R, Gao B, et al. Decoy Oligodesoxynucleotide Characterization of Transcription Factors Controlling Endothelin-B Receptor Expression in Vascular Smooth Muscle Cells. *Mol Pharmacol.* 2000;58(6):1333-40.
148. Weintraub WS, Jones EL, Craver JM, et al. Frequency of repeat coronary bypass or coronary angioplasty after coronary artery bypass surgery using saphenous venous grafts. *Am J Cardiol.* 1994;73:103-112.
149. Welt FG, Woods TC, Edelman ER. Oral heparin prevents neointimal hyperplasia after arterial injury. *Circulation.* 2001;104:3121-3124.
150. Wendel-Wellner M, Noll T, König P, et al. Cellular localization of the endothelin receptor subtypes ETA and ETB in the rat heart and their differential expression in coronary arteries, veins, and capillaries. *Histochem Cell Biol.* 2002;118:361-369.
151. White SJ, Newby AC. Gene therapy for all aspects of vein-graft-disease. *J Card Surg.* 2002;17:549-555.

152. Wirth K, Hock FJ, Albus U, et al. HOE 140 a new potent and long acting bradykinin antagonist: in vivo studies. *Br J Pharmacol.* 1991;102:774-777.
153. Wülfing P, Diallo R, Kersting C, et al. Expression of Endothelin-1, Endothelin-A, and Endothelin-B Receptor in Human Breast Cancer and Correlation with Long-Term Follow-Up. *Clin Canc Res.* 2003;9:4125-4131.
154. Yanagisawa M, Kurhara H, Kimura S, et al. A novel potent vasoconstrictor peptide produced by vascular endothelial cells. *Nature.* 1988;332:411-415.
155. Yusuf S, Sleight P, Dagenais G, et al. Effect of an angiotensin-converting enzyme inhibitor; ramipril, on cardiovascular events in high risk patients. The Heart Outcomes Prevention Evaluation (HOPE) Study investigators. *N Engl J Med.* 2000;342:145-53.
156. Ziche M, Morbidelli L. Nitric oxide and angiogenesis. *J Neurooncol.* 2000;50:139-148.

8. Anhang

8.1. Meine akademischen Lehrer

In Marburg:

Prof. Rudolf Arnold, Prof. Gerhard Aumüller, Prof. Karl-Heinz Austermann, PD Dr. Oliver Bandmann, Prof. Peter Barth, PD Dr. Detlef Bartsch, Prof. Erika Baum, PD Dr. Jörg Bayer, Prof. Thomas Behr, Prof. Helmut Bertalanffy, Prof. Siegfried Bien, PD Maria Byrne, Prof. Yalcin Cetin, Prof. Jürgen Daut, Prof. Heinrich Fruhstorf, Prof. Diethard Gemsa, Prof. Armin Geuss, Prof. Christian Görg, Prof. Leo Gotzen, PD Dr. Veronika Grau, Prof. Peter Griss, Prof. Karl-Heinz Grzeschik, Prof. Thomas Gudermann, Prof. Rudolf Happle, Prof. Andrej Hasilik, Prof. Klaus Heeg, PD Dr. Achim Hellinger, PD Dr. Mathias Herzum, Prof. Hartmut Jungclas, Prof. Horst-Franz Kern, Prof. Klaus-Jochen Klose, Prof. Jan Koolman, Dr. Heinz Köster, Prof. Volker Kretschmer, Prof. Jürgen-Christian Krieg, Prof. Peter Kroll, Prof. Harald Lange, Dr. Gerda Lemberg, Dr. Ronald Leppek, Prof. Burkhard Lippert, Prof. Bernhard Maisch, Prof. Hans-Dieter Mennel, Prof. Roland Moll, Prof. Rainer Moosdorf, Prof. Rainer Mutters, Prof. Andreas Neubauer, PD Dr. Christoph Nies, Prof. Wolfgang Oertel, Prof. Klaus-Heinrich Röhm, Prof. Matthias Rothmund, Prof. Klaus-Dieter Schulz, Prof. Werner Slenczka, Prof. Norbert Sommer, Dr. Dr. Horst E. Umstadt, Dr. Alessandro Vannucchi, Prof. Sebastian Vogt, PD Dr. Horst-Wilhelm Vohland, Prof. Karl-Heinz Voigt, Dr. Monika Weippert-Kretschmer, Prof. Jochen Werner und PD Dr. Thomas Zeiler.

In Portland, Oregon, USA:

Prof. Anthony P. Furnary, Prof. Albert Starr

8.2. Danksagung

Mein ganz besonderer Dank gilt Herrn Prof. Dr. Sebastian Vogt als Betreuer dieser Arbeit, der mir die Durchführung des Themas anvertraute und mir stets mit gutem Rat und Tat, innovativen Gedanken und viel Motivation zur Seite stand. Ohne die Weitergabe seiner umfangreichen Kenntnisse im operativen Bereich wäre diese Arbeit nicht zu bewältigen gewesen. Durch die Bildung einer Forschungsk Kooperation mit dem Physiologischen Institut der Universität Göttingen hat Prof. Vogt die Grundlage dieser Arbeit geschaffen.

Ferner gilt mein ausdrücklicher Dank Herrn Prof. Dr. Markus Hecker, Physiologisches Institut der Universität Heidelberg (vormals Göttingen), der für die Versuche die Medikamente und das verwendete decoy-Oligodesoxynucleotid zur Verfügung gestellt hat. Die Arbeitsgruppe von Prof. Hecker schaffte Grundlagen, auf denen diese Arbeit basiert.

Frau Dr. Sabine Pankuweit (Arbeitsgruppe molekulare Kardiologie an der Klinik für Innere Medizin – Kardiologie, Leiter: Prof. Dr. Bernhard Maisch) danke ich recht herzlich für die Unterstützung und Möglichkeit zur Nutzung der Video-Mikroskopier- und Vermessungseinheit. Herrn Dr. Andreas Schütz (AS), pathologisches Institut der Universität Leipzig und Frau Dr. Annette Ramaswamy (AR), pathologisches Institut der Universität Marburg, danke ich sehr herzlich für die Kontrolle der fachgerechten histologischen Auswertungen.

Herr Dr. Alexander Sattler, Klinik für Kardiologie, und Herr Dr. André Scherag, Institut für Biometrie am Fachbereich Medizin der Philipps-Universität standen mit unterstützendem Rat bei der Erstellung der statistischen Auswertung zur Verfügung, wofür ich ihnen sehr danke.

Dem Team der Tierpfleger der Abteilung für Theoretische Chirurgie der Universität Marburg danke ich besonders für Tipps und Tricks im Umgang mit den verwendeten Kaninchen und für die gute Pflege der Tiere.

8.3. Publikationen

Über die Ergebnisse dieser Arbeit wurde auf folgenden Kongressen berichtet:

Kusch B, Vogt S, Waldhans S, Wagner A, Moosdorf R, Hecker M

Inhibition of Venous Bypass Graft Stenosis by Peri-procedural Application of a Decoy Oligodesoxynucleotide Neutralizing Transcription Factor-Activator Protein-1. - 3rd Joint Meeting of the European Association of Cardio Thoracic Surgeons and the European Society of Thoracic Surgeons, Leipzig, 13. September 2004.

Kusch B, Vogt S, Waldhans S, Wagner A, Moosdorf R, Hecker M

Inhibition of venous bypass graft disease by suppression of deformation induced gene expression of pre-pro-endothelin-1 in vivo - decoy desoxynucleotide vs. Quinapril. Jahrestagung der Deutschen Gesellschaft für Thorax-, Herz- und Gefäßchirurgie, Congress Centrum Hamburg, 16. Februar 2005.

Teile der Arbeit sind zur Begutachtung und Veröffentlichung an die *Annals of Thoracic Surgery* verschickt worden:

Kusch B, Waldhans S, Wagner A, Hecker M, Moosdorf R, Vogt S

Inhibition of Carotis Venous Bypass Graft Disease by Intraoperative Nucleic Acid-Based Therapy in Rabbits.